

(51) 国際特許分類6

C12Q 1/68, C12M 1/00, G01N 33/50,  
C12N 15/10

A1

(11) 国際公開番号

WO98/33939

WO98/33939

(43) 国際公開日

1998年8月6日(06.08.98)

(21) 国際出願番号

PCT/JP97/00239

(22) 国際出願日

1997年1月31日(31.01.97)

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)

株式会社 日立製作所(HITACHI, LTD.)(JP/JP)

〒101 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地 Tokyo, (JP)

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)

穴沢 隆(ANAZAWA, Takashi)(JP/JP)

植松千宗(UEMATSU, Chihiro)(JP/JP)

〒185 東京都国分寺市西恋ヶ窪3-8-1 Tokyo, (JP)

岡野和宣(OKANO, Kazunori)(JP/JP)

〒353 埼玉県志木市本町5-17-2-402 Saitama, (JP)

神原秀記(KAMBARA, Hideki)(JP/JP)

〒192 東京都八王子市北野台1-4-3 Tokyo, (JP)

(74) 代理人

弁理士 小川勝男(OGAWA, Katsuo)

〒100 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号

株式会社 日立製作所内 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類

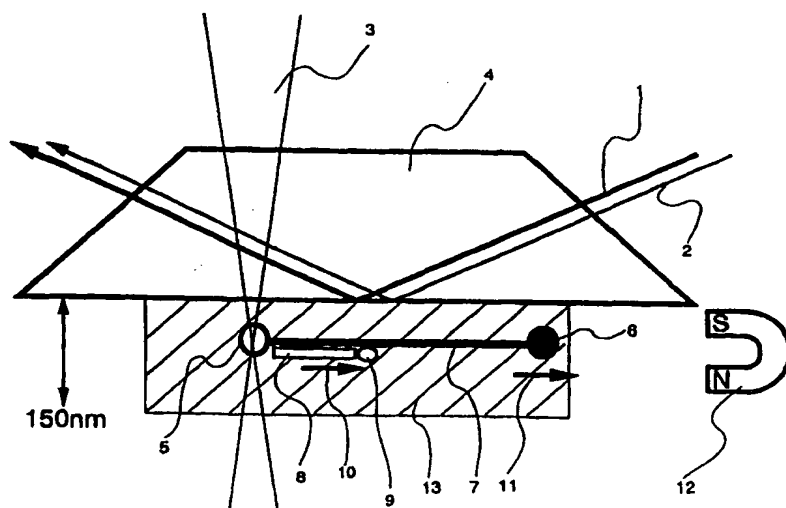
国際調査報告書

(54)Title: METHOD FOR DETERMINING NUCLEIC ACID BASE SEQUENCE AND APPARATUS THEREFOR

(54)発明の名称 核酸塩基配列決定法及び核酸塩基配列決定装置

## (57) Abstract

A method for determining a DNA base sequence which comprises fixing in an extended state a molecule of a single-stranded sample DNA (7) carrying a bead (5) at one end thereof and a magnetic bead (6) at the other end within the visual field of a fluorescence microscope by means of a magnetic force (11) and a laser trap (3); binding a primer (8) thereto; effecting an extension reaction (10) with a polymerase to thereby cause the incorporation of a single chemically modified nucleotide (9) alone labeled with a fluorescent substance differing from base species to base species; measuring exclusively the fluorescent substance thus incorporated as a fluorescent microscopic image by the evanescent irradiation (13) with an excitation laser (1); determining the base species from the fluorescent substance; liberating the fluorescent substance with which the incorporated nucleotide has been labeled by the evanescent irradiation (13) with an ultraviolet laser (2); and then effecting the step of the incorporation of the next nucleotide followed by repeating these steps. Thus, the base sequence can be determined by using a single DNA molecule, and a DNA consisting of several hundred bases or more can be efficiently sequenced.



一端にビーズ(5), 他端に磁気ビーズ(6)をもつ1本鎖試料DNA(7)の単一分子を磁力(11), レーザトラップ(3)で蛍光顕微鏡の視野内に伸長固定し, プライマー(8)を結合しポリメラーゼによる伸長反応(10)を行なう。塩基種毎に異なる蛍光体が標識された単一化学的修飾ヌクレオチド(9)のみが取り込まれる。励起レーザー(1)によるエバネッセント照射(13)で, 取り込まれた単一蛍光体のみが蛍光顕微鏡像として計測され, 蛍光体の種類から塩基種を決定する。紫外レーザー(2)によるエバネッセント照射(13)により, 取り込まれたヌクレオチドを標識する蛍光体を遊離し, 次のヌクレオチドを取り込む。以上を繰り返しDNA塩基配列決定を行なう。単一DNA分子を用いて塩基配列決定を実行でき, 数100k塩基以上のDNA塩基配列決定を効率的にできる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	イギリス	MC	モナコ	TD	チュニジア
AZ	アゼルバイジャン	GE	ジョージア	MD	モルドバ	TG	タンザニア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バハマ	GN	ギニア	MK	マケドニア共和国	TR	トルコ
BE	ベルギー	GW	ギニア・ビサウ			TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルガリア	GU	グアム	ML	マリ	UA	ウクライナ
BJ	ベナン	HN	ホンジュラス	MR	モロッコ	UG	ウガンダ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CA	カナダ	IS	アイスランド	NE	ネーデルラント	VN	ベトナム
CC	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	NL	オランダ	WU	ウイグル
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CH	スイス	KE	ケニア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボワール	KR	韓国	NP	ネパール		
CK	クック	KG	キルギス	PT	ポルトガル		
CM	カメルーン	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
CN	中国	LC	セント・ルシア	RU	ロシア		
CO	コロンビア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン		
CR	コスタリカ	LR	リベリア	SG	シンガポール		
CU	キューバ			SI	スロベニア		
CY	キプロス			SK	スロバキア		
CZ	チェコ			SL	シエラレオネ		
DE	ドイツ						
DK	デンマーク						
EE	エストニア						

## 明 細 書

## 核酸塩基配列決定法及び核酸塩基配列決定装置

## 技術分野

本発明は、DNA、RNA等の分析装置に関する。特にDNA、RNAの塩基配列決定、あるいは制限酵素断片や特定断片の解析に有効な装置に関する。

## 背景技術

DNA、RNA等の分析技術は、遺伝子解析や遺伝子診断を含む医学、生物学の分野で重要となっている。DNA、RNAの塩基配列決定、又は制限酵素断片や特定断片の解析はいずれも電気泳動による分子量分離を基本としている。予め断片又は断片群に放射性標識又は蛍光標識を施し、電気泳動した後又は電気泳動中に分子量分離展開パターンを計測し解析している。最近では、ゲノム解析に関連して、特にDNA塩基配列決定装置のニーズが高まり、装置の開発が進められている。以下、蛍光標識を用いるDNA塩基配列決定について説明する。電気泳動分離に先立ち、サンガー法によるジデオキシ反応を実行する。分析すべき試料DNAの既知の塩基配列部分と相補的な約20塩基長のオリゴヌクレオチドを合成し蛍光体を標識する。このオリゴヌクレオチドをプライマーとし、約 $10^{-12}$ molの試料DNAと相補鎖結合させて、ポリメラーゼにより相補鎖伸長反応を実行する。このとき基質として、4種のデオキシヌクレオチド3リン酸、即ち、デオキシアデノシン3リン酸(dATP)、デオキシシチジン3リン酸(dCTP)、デオキシグアノシン3リン酸(dGTP)、デオキシチミジン3リン酸(dTTP)、及びこれらに加えてジデオキシアデノシン3リン酸(ddATP)を加える。

ddATPが相補鎖伸長で取り込まれると、それ以上相補鎖が伸長しないため、アデニン（A）で終結する様々な長さの断片が調製される。上記反応でddATPの代わりに、ジデオキシシチジン3リン酸（ddCTP）、ジデオキシグアノシン3リン酸（ddGTP）、ジデオキシチミジン3リン酸（ddTTP）を各々加えた反応を独立に行なう。但し、各反応で用いるプライマーは、塩基配列は同じであるが、蛍光を分光して互いに識別できる4種の蛍光体を標識してある。

以上の4種の反応物を混合すると、試料DNAに相補的な約1000塩基長までの1塩基ずつ長さが異なる断片が、末端の塩基種に応じて異なる4種の蛍光体が標識されて調製される。各塩基長の断片数は各々約 $10^{-5}$ molである。次に、調製された試料を電気泳動により1塩基の分解能で分離する。電気泳動にはアクリルアミドを間隔約0.3mmの2枚のガラス板の間に重合させた平板ゲルが広く使用されている。平板ゲル上端に試料を注入し、平板ゲルの上下両端に電界を印加すると、試料は分離されながら下端方向に泳動する。電気泳動を実行しながら、上端より約30cmの位置をレーザーで照射すると、分離された蛍光標識断片が短いものから順にレーザー照射位置を通過し励起される。発光蛍光を複数のフィルターを用いて分光しながら計測すると、4種の蛍光体の蛍光強度の時間変化から、全ての断片の末端塩基種を短い断片から順に決定できる。この塩基種の順は試料DNAと相補的な関係にあり試料DNAの塩基配列を決定できる。

電気泳動を用いない新しいDNA塩基配列決定法がいくつか提案されている。第1の従来技術では、試料DNAを鋳型とするポリメラーゼによる相補鎖伸長反応を実行するとき、4種の基質を1種ずつ順番に加え、各段階で相補鎖に取り込まれた基質量を吸光や蛍光により定量して試料DNAの塩基配列を決定している（特開平4-505251号公報）。第2の従来技術では、試料DNAを鋳型とし、互いに異なる標識がされ

た4種の基質を用いてポリメラーゼによる相補鎖伸長反応を実行した後、エキソヌクレアーゼにより合成された相補鎖の3'末端から1塩基ずつ離脱させ、遊離した塩基の標識体を順番に測定して試料DNAの塩基配列を決定している(Journal of Biomolecular Structure & Dynamics 7, 301-309 (1989))。第3の従来技術では、DNAポリメラーゼの基質として鋳型DNAに取り込まれてDNA鎖伸長反応を保護基の存在により停止することができかつ検出され得る標識を持つ4種のdNTPの誘導體(MdNTP)を用いてDNAポリメラーゼ反応を行わせる工程、次いで取り込まれたMdNTPを検出する工程、及びMdNTPを伸長可能な状態に戻す工程を1サイクルとし、それを繰り返すことにより、試料DNAの塩基配列を決定している。この従来技術では、1塩基伸長時点でDNA鎖の伸長を停止させ、鋳型・プライマー・MdNTPの存在する系(溶液)から、酵素と基質を除去し、取り込まれたMdNTPを検出し、さらに鋳型に取り込まれたMdNTPの保護基(及び標識)を脱離して、DNA鎖伸長が可能な状態に導いている(特願平2-57978)。しかし、これらの提案は現在のところアイデアの段階であり、実用化されたという報告はない。

#### 発明の開示

現在、実用になっているDNA塩基配列決定法では電気泳動により分子量分離を行っている。DNA塩基配列決定には分子量分離に1塩基長の分解能が要求される。電気泳動の分解能は通常、分離すべき塩基長が長くなる程低下する。即ち、50塩基長と51塩基長の1塩基長は分離ができて、500塩基長と501塩基長の1塩基長は分離できるとは限らない。どれだけ長い塩基長まで1塩基長の分解能が得られるかを示す分離限界塩基長は、電気泳動の諸条件、即ち、分離媒体の組成、電気

泳動路長，電界強度で決定される。分離限界塩基長を大きくするために，これまでに様々な最適化が実行されてきたが，限界が1000塩基長を超える報告はされていない（Electrophoresis 13, 495-499 (1992), Electrophoresis 13, 616-619 (1992)）。分離限界塩基長が最大で1000塩基長であることは理論的にも説明されている（Electrophoresis 13, 574-582 (1992)）。即ち，電気泳動を用いる限り，1種の試料DNAから塩基配列決定できる長さは，最大でも1000塩基長である。一方，ゲノム解析に代表される大規模塩基配列決定では，分離限界塩基長が解析効率の鍵を握っている（Science 254, 59-67 (1991)）。例えば，代表的な大型のクローンであるYACクローンは約1M塩基長あるので，1000塩基長ずつ分析すると最低限1000個の試料の分析が必要である。しかし，長いDNAの端から順に1000塩基長ずつの断片を過不足なく調製できない。実際には，ランダムな断片を調製し，ランダムに分析し，断片同士での塩基配列のオーバーラップを利用してもとの長いDNAの塩基配列を再構成している。この方法はショットガン法と呼ばれ，現在ゲノム解析で最も広く使用されている方法であるが，ランダムな断片に対して再構成し得るオーバーラップを持たせるため，同じ塩基配列を何度も重複して分析する必要があるという問題がある。

この重複の度合いはリダンダンシーと呼ばれ，1度に塩基配列決定できる塩基長，即ち，電気泳動の分離限界塩基長が小さい程大きくなる。分離限界塩基長が1000塩基長ではリダンダンシーは約10を要する。即ち，塩基配列を決定すべきDNAの10倍の長さの塩基配列決定を実行する必要がある。従って，1M塩基長の塩基配列決定には約1万個の試料の分析が必要である。1台のDNA塩基配列決定装置で分析できる試料数は1日当り最大でも100試料である。1台で1M塩基長全ての

塩基配列の決定には少なくとも100日はかかる計算になる。ゲノム解析や今後重要度の増す遺伝子診断を実効的に実行するには、1M塩基長の塩基配列の決定を数日間で成し遂げる技術が必要である。

従来技術の他の問題は、塩基配列決定のために試料DNAが多数必要な点にある。サンガー法によるジデオキシ反応の実行には、1試料につき通常約 $10^{-12}$ molの試料DNAを要するため、クローニングやPCR等の技術を用いて予め試料DNAを精製、増幅する必要がある。これらの技術は手間と時間を要し、ゲノム解析の進行の大きな律速過程の一つになっている。効率的にゲノム解析や遺伝子診断を進めるには、少量の試料DNA、究極的には単一DNA分子から塩基配列決定ができる技術が必要である。しかし、従来提案されている電気泳動を用いないDNA塩基配列決定法には次のような問題がある。

第1の従来技術の例では、4種のヌクレオチド基質を1種ずつ順番に加えるため、相補鎖伸長反応を実行する溶液組成を繰り返し変化させる必要がある。また、溶液中の塩基種を変化させる際には、異種の塩基種の混在を防ぐために洗浄が必要である。従って、1回のサイクルにつき少なくとも8回の溶液交換が必要になる。通常、平均的には1回のサイクルで1塩基が決定されるので、8回の溶液交換は塩基配列の決定速度をかなり低下させる。第1の従来技術の最も本質的な問題点は、相補鎖が伸長するに従って定量すべき信号量が蓄積され、1塩基の取り込みに対応する信号量の変化の測定が困難になる点にある。即ち、長い塩基長のDNA塩基配列決定は困難である。

第2の従来技術では、4種の蛍光体を標識した4種の塩基全てを相補鎖に取り込ませているが、このことは技術的に困難である。後述するように、蛍光量が大きく、また蛍光の分光により互いに識別できる蛍光体は分子サイズが大きいため、複数の蛍光標識ヌクレオチドが同一相補鎖内に隣り合って取り込まれることは立体障害のため困難である。第2の

従来技術の他の問題は、エキソヌクレアーゼによる1塩基ずつの離脱の制御が困難な点にある。検出限界時間以下の範囲で連続して複数の塩基が離脱された場合、離脱した塩基は同時に検出されるため、離脱した塩基の順番、即ち、塩基配列が決定できなくなる。塩基配列決定のために各塩基の離脱が連続せずに断続的に生じる必要があるが、このような制御は困難である。

第3の従来技術の例では、鋳型に取り込まれたMdNTPを検出する工程、及びMdNTPを伸長可能な状態に戻す工程では、溶液中から鋳型に取り込まれていないMdNTPを除去し、次の新しいサイクルの開始時点で溶液中にMdNTPを加える必要がある。これを怠ると、鋳型に取り込まれたMdNTPからの信号と鋳型に取り込まれていないMdNTPからの信号とが混合してしまい、目的とする鋳型に取り込まれたMdNTPからの信号を正確に計測できない。また、鋳型に取り込まれていないMdNTPの保護基も脱離され、保護基の離脱したdNTPが鋳型に取り込まれると所定のサイクルが進行しなくなる。従って、1回のサイクルにつき少なくとも2回の溶液内容の変更が必要であり、塩基配列決定速度を低下させる原因になる。このように、溶液内容の変更が不完全で溶液中にわずかでも鋳型に取り込まれていないMdNTPが残留すると、計測の際の大きなノイズの原因になってしまうという問題がある。

本発明の目的は、従来提案されている電気泳動を用いた塩基配列決定法の諸問題を解決するために、ポリメラーゼによる相補鎖伸長反応の際に取り込まれるヌクレオチドの離脱順序によって順番に決定することにより、非常に長いDNAの塩基配列を決定する方法、装置を提供する。

本発明では、鋳型DNA単分子（試料）を蛍光顕微鏡の視野内に保持し、相補鎖伸長を1塩基ずつ制御して実行し、取り込まれた蛍光標識さ



れた1塩基を単分子計測する。DNA塩基配列決定の実行には、ポリメラーゼによる相補鎖伸長反応で取り込まれるヌクレオチドの塩基種を1塩基毎にモニターできれば良い。(1)1個のヌクレオチドが取り込まれた後は伸長反応が進まないこと、(2)取り込まれた1個のヌクレオチドの塩基種を判定した後で、次の1個のヌクレオチドの取り込みを可能とする、2つの条件を同時に満足するように、化学修飾を取り込まれるべき全ヌクレオチドに施す。この2つの条件は、例えば、蛍光体を標識として持つケージド化合物と、ヌクレオチドと組み合わせて達成できる。ケージド化合物は生理活性物質の活性に関与する残基をニトロベンジル基等によってマスクし、光照射によって修飾基を解離させる化合物をさす。例えば、ケージド化合物は2-ニトロベンジル基が導入された物質であり、紫外光照射により2-ニトロベンジル基を遊離し、生物学の分野で広く使用されている(Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 18, 239-270 (1989))。モレキュラー・プローブス社等から多種類のケージド化合物が販売されている。本発明で用いる化学修飾ヌクレオチドは、第1図に示すように、生理活性のある基質X(ヌクレオチド)に2-ニトロベンジル基を結合したケージド化合物であり、化学修飾ヌクレオチドの本来の活性、即ち相補鎖合成反応で連続的に取り込まれる活性を抑えておき、360nm以下の紫外線を照射してケージド物質(2-ニトロベンジル基)を遊離させ、本来の生理活性を持つ基質X又はHXに変換できる性能を有する。第1図においてRはHやアルキル基(例えば、CH<sub>3</sub>)等である。

上記の性能を有する化学修飾ヌクレオチドの例として、Texas Red 標識ケージドdGTPの製法を第3図から第7図に示した。第3図は、塩基に化学修飾する場合の出発物質であるdGTP(第2図)の誘導体(Science 238, 336-341, 1987)に、水溶性カルボジイミド(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH)を作用させて、リ

ンカー末端をカルボキシル基とする dGTP 誘導体を得る。一方、第 4 図に示すように、2-nitroacetophenon (Aldrich, N920-9) に硝酸を作用させて、炭素 4 の位置にニトロ基を導入し、このニトロ基を還元してアミノ基に変換する。第 5 図に示すように、Texas Red (Molecular Probes, T-353) に、第 4 図の左辺の化合物を作用させ結合させる。次いで、第 6 図に示すように、第 5 図の右辺の化合物に  $\text{NH}_2\text{-NH}_2$  を作用させ、さらに  $\text{MnO}_2$  を作用させて、第 6 図の左辺の化合物のアセトフェノン基をジアゾエタン基に変換する (J. Am. Chem. Soc. 110, 7170-7177, (1988))。第 3 図と第 6 図の右辺の化合物を作用させ、第 7 図に示すように、標識として Texas Red が結合した 2-ニトロベンジル基が導入された dGTP である蛍光標識 (Texas Red) ケージドヌクレオチド (dGTP) を得る。他の塩基種についても、異なる蛍光体を用いて上記と同様な方法で蛍光標識ケージドヌクレオチド (蛍光標識が付加したケージド化合物が結合したヌクレオチド) を合成できる。

第 7 図に示す物質のようにヌクレオチドの塩基の位置で標識された物質はポリメラーゼによる相補鎖伸長反応により、取り込まれ得ることは種々の実験で確認されている。例えば、塩基の位置が種々の蛍光体で標識されたジデオキシヌクレオチド ddNTP、即ち、相補鎖合成のターミネーターが相補鎖合成で取り込まれることが確認されている (Nucleic Acids Res. 20, 2471-2483 (1992))。蛍光体の分子サイズが大きい場合、立体障害が生じるために 2 個以上の蛍光標識デオキシヌクレオチドが連続して取り込まれることはない (Anal. Biochem. 234, 166-174 (1996))。即ち、第 7 図のように比較的大きな蛍光体が標識されたデオキシヌクレオチドは相補鎖合成で取り込まれ得るが、一度取り込まれるとそれ以

上相補鎖が伸長しなくなる。第7図に示す化合物に360nm以下の紫外線を照射すると、第8図に示すように、第1図に示す光化学反応に従って化学構造が変化して、蛍光体が付加したケージド物質が第7図に示す化合物の塩基の位置から遊離する。相補鎖に取り込まれた状態で同様の反応を生じさせれば、立体障害が排除されて再び相補鎖が伸長する。この時、第8図に示すように塩基にリンカー部分が残留するが、このリンカー部分のサイズは小さいために相補鎖伸長に影響は与えない。

即ち、第7図のTexas Red標識ケージドdGTP、及び異なる蛍光体で標識されたケージドdATP、dCTP、dTTPを基質としてポリメラーゼ相補鎖伸長反応を実行すれば、上記に示した1塩基ずつの伸長反応の制御ができ、蛍光計測により取り込まれた塩基種の同定もできる。蛍光計測は励起レーザを照射し、取り込まれたヌクレオチドだけを励起し、他の浮遊するヌクレオチドは励起しないようにするために、両者を空間的に分離した後レーザを照射したり、後述するエバネッセント照射を用いる。以上の工程、即ち、(1)ポリメラーゼにより蛍光標識ケージドヌクレオチドを1個取り込ませる、(2)レーザ照射により取り込まれた蛍光標識を励起する、(3)発光蛍光を分光して蛍光体種から塩基種を判定する、(4)紫外線照射による光化学反応により蛍光標識ケージド物質を遊離させる、ことを繰り返して、ポリメラーゼにより順次蛍光標識ケージドヌクレオチドを1個ずつ取り込ませて、鋳型DNAの塩基配列を決定できる。

次に、取り込まれた1個のヌクレオチドを標識する蛍光体からの蛍光を検出する単分子計測について説明する。第9図は、この単分子計測を行なう装置の主要部の概略構成を示す図である。単分子計測は不純物、ごみ等を極度に嫌うため、全ての操作はクリーンルーム内で実行し、あらゆる光学系に細心の注意を払う。緩衝液を満たしたセルを倒立蛍光顕微鏡の対物レンズの上方に配置し、緩衝液中で蛍光顕微鏡の視野内に鋳

## 10

型となる試料DNA 7を後述する技術により保持する。試料DNAが保持される位置はセル内の上表面に近接させ、上表面からの距離を100 nm以下に保つ。セル外の上表面にはプリズム4を配置する。励起レーザー1をプリズム4を介して斜め右上方より導入し、セル内の上表面で全反射させ、再びプリズム4を介して斜め左上方へ誘導する。この時、セル内の緩衝液の上表面付近にエバネッセント波13と呼ばれる励起光が僅かに浸み込む。この励起光の強度はセル内の上表面から離れるに従って指数関数的に減少し、515 nmのArレーザーを用いた場合、上表面から約150 nm離れた位置で強度が $1/e$ になる。この照射方法はエバネッセント照射法と呼ばれる。このエバネッセント照射法を用いれば、セル内の表面から150 nm以下に存在する物質だけが励起され、水のラマン散乱を初めとする蛍光計測の背景光を極限的に減少でき、単分子の蛍光計測ができる(Nature 374, 555-559 (1995))。発光した蛍光はセルの下方より対物レンズを介して高感度2次元カメラにより蛍光顕微鏡像としてモニターされる。プライマー8を起点としたポリメラーゼ反応10で取り込まれた1個の蛍光標識されたヌクレオチド(蛍光標識ケージドヌクレオチド)9は鋳型DNA 7に固定されるため、蛍光は2次元像中で輝点として観測される。

一方、取り込まれずに浮遊する蛍光標識ヌクレオチドはブラウン運動によりセル内を3次元的に激しく動き回っているため、1個ずつの蛍光体が2次元像中で輝点として観測されず、全体的な背景光の増加となって表われる。しかし、蛍光体が励起される空間は僅かセル内の表面から150 nm以下の範囲であるため、背景光の増加分は小さく、鋳型DNAに固定された蛍光体の単分子計測はできる。2次元像は受光光学系上に配置されたプリズムにより4つに分割して、異なるフィルターを通して検出して瞬時にその蛍光体種を識別し、取り込まれたヌクレオチドの塩基種を判定する。この蛍光選別法については特開平2-269936

号公報に詳しく記載されている。取り込まれたヌクレオチド9の蛍光標識ケージド物質を遊離させる時も同様にしてエバネッセント照射法を用いる。紫外パルスレーザ2をプリズム4を介して斜め右上方より導入し、セルの上表面で全反射させ、再びプリズム4を介して斜め左上方へ誘導する。セル内の表面から150nm以下の範囲が紫外線照射され、取り込まれたヌクレオチドの蛍光標識ケージド物質が選択的に遊離される。このとき、セル内の表面から150nm以下の範囲にたまたま存在した極少数の浮遊するヌクレオチドの蛍光標識ケージド物質も遊離され、生成された非化学修飾ヌクレオチドが後のポリメラーゼ反応で取り込まれてしまう可能性がある。この可能性をゼロにするため、フレッシュな緩衝液を供給するようにセル中の緩衝液は常に一方向にフローさせる。

次に、鋳型DNA7の単分子を蛍光顕微鏡の視野内に保持する構成について説明する。鋳型となる試料DNA7の両端に径が約100nmのビーズ（固相担体）5、6を結合させる。ビーズの材質はポリスチレンからなり、一方のビーズ6は磁性を帯びている。この試料DNA7をセル内の緩衝液中に導入し、単一DNA分子の磁性を帯びていない側のビーズ5をレーザトラップ3によりセル中の顕微鏡の視野内に捕捉する（Science 271, 795-799 (1996)）。レーザを代表的な光源とする光ピンセットは非接触型のマニピュレーターとして最近急速に普及しつつある技術である（Optics Lett. 11, 288-290 (1986)）。特に赤外レーザによるレーザトラップは生体試料を扱う場合、照射の影響が最小になるため、広く利用されている（特開平2-91545号公報）。レーザ光をレンズにより水中で集光させると、水中の微粒子をその焦点近傍に数pN/mWの拘束力で捕獲できる。単一の試料DNA7の片側のビーズ（固相担体）5のレーザトラップが完了した後、セルの上下の面に平行な方向に電磁石12により磁場を印加し、逆側の磁性を帯びたビーズ6に静磁力11を発

生させ、単一DNA分子7を引き伸ばす（Science 271, 1835-1837 (1996)）。引き伸ばす力は磁場の大きさを変化させて制御する。この状態を保ち、セルが固定されている顕微鏡のステージをゆっくり下げ、単一DNA分子7を捕捉しながらセル内の上表面に100nm以下まで近接させる。

以上説明したように、本発明では、1種の試料DNAから塩基配列決定でき、塩基長はポリメラーゼが相補鎖を合成できる限界の長さまで迫ることができる。相補鎖伸長を行っていたポリメラーゼ分子がDNA分子から離れ、再び他のポリメラーゼ分子が相補鎖伸長の続きを行っても計測上全く問題はない。即ち、活性のあるポリメラーゼを順次供給すれば、殆ど望むだけの長さの塩基配列が決定できる。第1の従来技術で問題であった繰り返しの溶液交換は本発明では不要である。また、本発明では相補鎖に取り込まれた蛍光体を1回のサイクル毎に離脱させるので、蛍光体からの信号量が蓄積する問題がなく、DNAの塩基長によらず塩基配列決定ができる。一方、第2の従来技術で問題であった蛍光体の連続した相補鎖への取り込みは本発明では不要である。また第2の従来技術では酵素の活性の制御により1塩基毎の離脱や伸長の制御が困難であったが、本発明では構造的に伸長を制御するので、酵素の活性によらずに1塩基毎の伸長の制御ができる。さらに、第3の従来技術で問題であった溶液内容の変更は本発明では不要である。即ち、本発明では、鋳型に取り込まれていない化学修飾ヌクレオチドが共存した状態で、鋳型に取り込まれた化学修飾ヌクレオチドだけを選択的に計測でき、また、化学修飾物質の脱離も鋳型に取り込まれたヌクレオチドだけに選択的にできるので、サイクルの途中で溶液内容から鋳型に取り込まれていない化学修飾ヌクレオチドを除去する必要がない。

本発明による塩基配列決定の速度は先に説明した工程のサイクルタイムに依存する。ポリメラーゼにより蛍光標識ケージドヌクレオチドを1

## 13

個取り込ませる工程は0.1秒以下で実行できる。様々な種類のDNAポリメラーゼが市販されているが、最も遅い伸長速度の場合、1秒間当り30塩基のヌクレオチドを取り込むことができる。即ち、1塩基取り込むための平均時間は0.03秒であり、上記の0.1秒はかなり余裕を見た値である。レーザー照射により取り込まれた1個のケージドヌクレオチドを励起し、蛍光発光を分光して蛍光体種から塩基種を判定する工程には0.5秒を要する。

単分子蛍光計測はテレビレート、即ち、0.03秒以下の露光時間でも良いが(Nature 374, 555-559 (1995)), 本発明では高感度に計測するため0.5秒の露光時間を設定する。レーザー照射時間も0.5秒で蛍光露光と同期させる。蛍光体種から塩基種の判定は0.1秒以下で完了するが、次の工程の裏で同時に判定処理できるので、サイクルタイムに影響を与えない。紫外線照射により蛍光標識ケージド物質を遊離させる工程は0.1秒以下で完了できる。10ナノ秒の紫外パルスレーザー照射により蛍光標識ケージド物質をミリ秒のオーダーで遊離できる(Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 18, 239-270 (1989))。以上の工程をコンピュータで自動的に繰り返す際、レーザーやカメラの制御に要する時間をサイクル当り0.3秒と仮定しても、1回のサイクルを1秒で繰り返すことができる。1回のサイクルで1個の塩基の種類を決定できるので、塩基配列決定の速度は1塩基/秒以下になる。本発明の方法を代表的な大型のクローンであるYACクローンの1M塩基長の塩基配列決定に適用すると、1M秒、即ち、約12日間で終了でき、従来法で実行した場合より1桁短い時間となる。本発明の方法では、顕微鏡の同一視野内に複数の試料DNAを保持して並列して処理できる。また、同一試料DNAの異なる位置の塩基配列を同時に決定できる。例えば、上記1M塩基長の試料DNAの2本鎖を分離し、両鎖を顕微鏡の視野内で独立して計

異なる位置に各々固定する。両鎖を独立に塩基配列決定すれば試料DNAを両側から解読することになり、先の2倍の速度で試料の全塩基配列決定できる。即ち、僅か6日間で1Mの塩基長の単分子の塩基配列決定でき、非常に効率的なゲノム解析や遺伝子診断ができる。

#### 図面の簡単な説明

第1図は本発明で用いるケージド化合物の紫外線照射による光化学反応を示す図、第2図、第3図、第4図、第5図、第6図、第7図は、本発明における化学修飾ヌクレオチドを調製する際の出発物質であるdGTP誘導体からの化学反応を示す図、第8図は本発明の実施例で用いるTexas Red標識ケージドdGTPの光分解反応を示す図、第9図は本発明の実施例の単分子計測を行なう装置の主要部の概略構成を示す図、第10図は本発明の実施例の計測装置の概略構成を示す図、第11図は本発明の実施例のセルの構成を示す模式図、第12図は本発明の実施例のプリズムの構成を示す図、第13図は本発明の実施例の顕微鏡の視野と4分割される結像面を示す図、第14図は本発明の実施例で用いる両端にオリゴヌクレオチドが導入される試料DNAの構成を示す図、第15図は本発明の実施例で用いる両端にビーズ（固相担体）、磁珠（固相担体）が結合される試料DNAの構成を示す図、第16図は本発明の実施例で用いるBODIPY標識ケージドdATPの構造を示す図、第17図は本発明の実施例で用いるBODIPY標識ケージドdCTPの構造を示す図、第18図は本発明の実施例で用いるBODIPY標識ケージドdGTPの構造を示す図、第19図は本発明の実施例で用いるBODIPY標識ケージドdTTPの構造を示す図、第20図、第21図、第22図、第23図は本発明の実施例での顕微鏡像モニター視野内へ試料DNA固定を説明する図、第24図は本発明の実施例での顕微鏡視野内の1発光点に対応する分割された4つの蛍光顕微鏡像



## 15

を模式的に示す図、第25図は本発明の実施例での顕微鏡視野内に固定された10種の試料DNAと相補なオリゴヌクレオチドを示す図、第26図は本発明の実施例において相補なオリゴヌクレオチドを用いてセル内に捕捉された10種の試料DNAを模式的に示す図、第27図は本発明の実施例で用いる蛍光標識ケージドdATPの構造を示す図、第28図は本発明の実施例で用いる蛍光標識ケージドdCTPの構造を示す図、第29図は本発明の実施例で用いる蛍光標識ケージドdGTPの構造を示す図、第30図は本発明の実施例で用いる蛍光標識ケージドdTTPの構造を示す図、第31図は本発明の実施例で用いる蛍光標識ケージドdATPの構造を示す図、第32図は本発明の実施例で用いる蛍光標識ケージドdCTPの構造を示す図、第33図は本発明の実施例で用いる蛍光標識ケージドdGTPの構造を示す図、第34図は本発明の実施例で用いる蛍光標識ケージドdTTPの構造を示す図、第35図は本発明の実施例で用いるプリズム内部のレーザの多重反射を説明する図、第36図は本発明の実施例で用いる光ファイバー内部のレーザの多重反射を説明する図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明を詳細に説明するために、以下、添付の図面に従ってこれを説明する。

##### (実施例1)

塵等の不純物質が光学系や試料溶液に混入しないように、全ての操作はクラス1000のクリーンルーム内で実行する。第10図により本実施例に係わる装置全体の構成を説明する。顕微鏡は倒立型の位相差兼落射蛍光顕微鏡（オリンパス社製，IMT2-RFC）を用いる。この顕微鏡は視野を固定したまま，位相差像と蛍光像を切り替えて観察できる。対物レンズ27は油浸100倍（オリンパス社製，プラン・アポクロマ

ート×100, 1.40NA)を用いる。このとき視野の大きさは径が約100 $\mu$ mである。対物レンズ27の上部の顕微鏡のステージ26の上に温度調節機能を備えたセル25を設置する。第11図にセルの構造を示す。セルの上面37は厚さ1mmの石英性スライドガラス、セルの下面38は厚さ0.1mmの石英性カバーガラスからなり、両ガラス板の間隔は0.2mmである。セルの左右の両端には細管39, 40が接続されており、一方の細管39からセルの内部に溶液を導入し他方の細管40から排出する。セルの内部での溶液の流速はポンプにより制御する。ポンプは脈流を避けるため、重力落差を利用するタイプを用いる。セルの上下面の、顕微鏡の視野の近傍を除いた部分にペルチエ素子を接続し、セル全体が0℃から100℃までの範囲で温度調節可能とする。対物レンズ27とセルの外下面38は光照射により蛍光を発しない無蛍光オイルを介して接触させる。第10図に示すステージ26の上のセル25の右側に電磁石を配置し、セル内の水平方向に磁場を発生させ、セル中の磁性体がセルの右方向に静電磁力を受けるようにする。

セル外の上面37に、第10図に示すように60°の傾斜の石英製プリズム24を光照射により蛍光を発しない無蛍光グリセリンを介して接触させる。第12図にプリズム24の形状を示す。ステージ26に対して垂直上方より位相差像観察のためのハロゲンランプ22からの光を、コンデンサーレンズ23で集光させて、プリズム24の上面の平面部分を通してセル中に照射する。また、ステージ26に対して68°の入射角度で斜め上方より、第10図に示すプリズム24の右側斜面部分を通して、488nmのArイオンレーザ15(20mW), 532nmのYAGレーザ16(20mW), 及び355nmのパルス発振YAGレーザ17(10mJ)をセル25に照射し、セル内の表面で全反射させる。これら3種のレーザビームは全反射ミラー18, ダイクロイックミラー19, 20を用いて同軸ビーム21とし、焦点距離100mmのレ

レンズにより直径約  $100\text{ }\mu\text{m}$  に集光し、顕微鏡の視野の位置で全反射させる。全反射したレーザービーム 21 は、ステージ 26 に対して斜め上方に、第 10 図に示すプリズム 24 の左側斜面部分を通して出射させる。一方、 $1064\text{ nm}$  の YAG レーザ 14 ( $100\text{ mW}$ ) をダイクロイックミラー 28 により反射させ、対物レンズ 27 を通して集光し、セル中に照射する。レーザービーム 21' は対物レンズ 27 により直径約  $1\text{ }\mu\text{m}$  以下に集光し、顕微鏡の視野内のセル中に焦点をセットする。ダイクロイックミラーは  $45^\circ$  の入射光に対して赤外光を選択的に反射するように設計する。ハロゲンランプ 22 からの光及び 4 種のレーザー 14, 15, 16, 17 は、コンピュータによりその出力や発振又はセル 25 への照射を制御する。

顕微鏡の視野内での蛍光発光は、対物レンズ 27 によりほぼ平行光束にされ、ダイクロイックミラー 28 及び赤外カットフィルター 29 を透過し、ビームスプリッター 30 によって光路を 2 方向に分けられる。ビームスプリッター 30 はハーフミラー、全反射ミラー、又はミラーなしの 3 段階を自由に切り替え可能で、0% から 100% の間の所定の比率で光を分配できる。赤外カットフィルター 29 はダイクロイックミラー 28 で除き切れなかった  $1064\text{ nm}$  の光を完全にカットするためにセットする。ビームスプリッター 30 で反射した方向の光路は、2.5 倍の撮影レンズ 35 (オリンパス社製, NFK $\times 2.5$ ) により結像され、ビデオレートの CCD カメラ 36 で 2 次元検出される。この CCD カメラ 36 は主に試料 DNA の捕捉を行なう際に用いる。ビデオ信号はモニターによりビデオレートのリアルタイムで観察できる。CCD カメラの検出面の大きさは  $12.8 \times 12.8\text{ mm}$  であり、 $25 \times 25\text{ }\mu\text{m}$  の大きさの 1 画素が、 $512 \times 512$  画素並んで構成されている。結像面での像倍率は  $100 \times 2.5 = 250$  倍なので、視野の大きさは  $51.2 \times 51.2\text{ }\mu\text{m}$ 、1 画素は  $0.1 \times 0.1\text{ }\mu\text{m}$  に対応する。一方、対物

## 18

レンズ27の下方への光は、4分割プリズム31と4種の干渉フィルター32を組み合わせた光学素子を透過させた後、2.5倍の撮影レンズ33（オリンパス社製、NFK×2.5）により結像され、冷却型2次元CCDカメラ34で2次元検出される。この冷却型2次元CCDカメラ34は主に蛍光計測に用いる。冷却型2次元CCDカメラの検出面の大きさは $25.6 \times 25.6$  mmであり、 $25 \times 25 \mu\text{m}$ の大きさの1画素が、 $1024 \times 1024$ 画素並んで構成されている。結像面での像倍率は $100 \times 2.5 = 250$ 倍なので、1画素は $0.1 \times 0.1 \mu\text{m}$ に対応する。

第13図に示すように、光路に挿入された4分割プリズム31により、 $51.2 \times 51.2 \mu\text{m}$ の視野の像41を4つに分割する。分割された各像のサイズは、検出面で $12.8 \times 12.8$  mmの像42であり、4つの各像が互いに重なり合わないよう、 $25.6 \times 25.6$  mmの像43の大きさに結像させる。4つの各像に対応させる干渉フィルターは、各々、 $500 \sim 520$  nm、 $540 \sim 560$  nm、 $560 \sim 580$  nm、 $580 \sim 600$  nmの波長域で透過率70%以上の透過帯を持ち、 $300 \sim 1100$  nmの波長範囲のこれら透過帯以外での透過率は $10^{-4}$ 以下とする。また、レーザ波長である $355$  nm、 $488$  nm、 $532$  nmの透過率は $10^{-6}$ 以下とする。顕微鏡の視野内の1点から発した蛍光は、冷却CCDカメラ検出面上で4つの点に分割されて結像され、結像された4つの各点に座標が対応付けられる。従って、 $1024 \times 1024$ 画素の上の複数の輝点の中から対応する4点の輝度情報だけを選択的にコンピューターに転送できる。4つの各点は上記の4種の異なる干渉フィルターを透過して検出され、発光する蛍光体の種類により各点の蛍光強度比率が異なる。4点の蛍光強度の比率を計測して発光した蛍光体の種類を識別できる。以下、実際の計測手順に従って実施例を詳細に説明する。モデル試料として $\lambda$  DNAの全塩基配列決定を実行する。 $\lambda$  D

NAは48502塩基長でその全塩基配列が既知であるので、本発明の方法の原理確認を実行するための試料として最適である。 $\lambda$  DNAは2本鎖の直鎖の状態で購入する。両末端に相補的な2本鎖オリゴヌクレオチドを合成し、これをライゲース反応により両末端に結合させる。第14図に示すように、合成2本鎖オリゴヌクレオチドの内、 $\lambda$  DNA 44, 45の5'末端に結合するオリゴヌクレオチド47の5'末端にはビオチン49を標識し、 $\lambda$  DNA 44, 45の3'末端に結合するオリゴヌクレオチド46の3'末端にはジゴキシン48を標識してある。合成2本鎖オリゴヌクレオチドの $\lambda$  DNAと相補的でない部分の塩基配列は20塩基以上とし、後のポリメラーゼ反応の際のプライミングサイトとする。

一方、第15図に示すように、直径約0.1  $\mu$ mのポリスチレンビーズ（固相担体）52の外表面にストレプトアビジン50を酸アミド結合により導入する。また、直径約0.1  $\mu$ mの磁気帯性ポリスチレンビーズ（固相担体）53の外表面に抗ジゴキシン抗体51を酸アミド結合により導入する。ライゲーションさせた $\lambda$  DNA 44, 45を1本鎖状態に変性し、上記のビーズを加える。ビオチン49とストレプトアビジン50、ジゴキシン48と抗ジゴキシン抗体51は非常に特異的で高い結合定数で結合するので、 $\lambda$  DNA 44, 45は両鎖ともに5'末端には磁性を帯びていないビーズ52が結合し、3'末端には磁性を帯びたビーズ53が結合する。第16図から第19図に示す構造を持つ4種の化学修飾ヌクレオチドを、第3図から第7図で説明した方法と同様な方法で合成する。第16図はBODIPY 493/503 C3 (Molecular Probes, Inc. 製, D-2190) を標識として持つケージドdATP, 第17図はBODIPY 530/550 C3 (Molecular Probes, Inc., D-2186) を標識として持つケージドdCTP, 第18図はBODIPY 564/

570 C3 (Molecular Probes, Inc., D-2221) を標識として持つケージドdGTP, 第19図はBODIPY 581/591 C3 (Molecular Probes, Inc. 製, D-2227) を標識として持つケージドdTTPである。未修飾ヌクレオチド等の不純物はカラム等で取り除いておく。

両端にビーズ52, 53を結合した $\lambda$ DNA44, 45を1本鎖状態のまま, 顕微鏡のステージ26に固定されたセル25の中に緩衝液をフローさせて導入する。まず, 位相差顕微鏡モードにし, 第10図に示すビームスプリッター30を100%反射ミラーとして, 試料DNA捕捉用のCCDカメラ36でビデオモニターを用いて, 緩衝液のフローを停止して第20図から第23図に示す視野54を観察する。第20図に示すように, モニター上で試料DNA44, 45の5'末端側に結合した磁性を帯びていないビーズ52を見つける。ステージを水平方向に移動して(56), 第21図に示すように, モニター上の左側中央部に設定してある1064nmの赤外レーザの焦点の位置55に, 上記の找けたビーズ52を置く。次いで1064nmの赤外レーザを発振させ, レーザトラップにより上記の找けたビーズ52を所定のビーズとして捕捉する(57)。捕捉できたか否かは, ステージを移動させればすぐに分かる。緩衝液を再びフローさせ(58), 第22図に示すように, 捕捉していない他のビーズや試料DNAを視野の外に運び出す。次に電磁石により水平方向に磁場を発生させ, 第23図に示すように試料DNAの3'末端側に結合した磁性を帯びたビーズ53をモニター上で右方向に引き寄せ(59), 両端のビーズで挟まれた試料DNA44, 45を引き伸ばす。これら2個のビーズが単一のDNAの両端に結合していることの確認は, 赤外レーザの焦点位置55を移動させて, 右側のビーズ53がその動きに同期することを見れば良い。DNA分子を引き伸ばし過ぎないように電磁力を調節する。この方法で $\lambda$ DNA44, 45を引

## 21

き伸ばすと全長は約  $16.5 \mu\text{m}$  になり、顕微鏡の視野  $51.2 \times 51.2 \mu\text{m}$  に十分収まる。顕微鏡のステージをゆっくりと引き下げて、両端のビーズを保持した状態で試料DNAをセル内の上表面に近づけていき、ビーズ又はDNAが上表面にちょうど接触したところでステージを固定する。このとき試料DNAは上表面から  $0.1 \mu\text{m}$  以下の空間に保持されている。以下で説明するポリメラーゼ反応の実行の際にも、両端のビーズを固定するための  $1064 \text{ nm}$  のレーザ及び電磁石は作用させ続けて、 $\lambda$  DNAを捕捉しておく。

次に、位相差顕微鏡モードから蛍光顕微鏡モードに切り替え、第10図示すビームスプリッター30をミラーなしの状態として、冷却型CCDカメラ39に全蛍光を入射させる。レーザ光以外の光がセル中に混入しないように、顕微鏡が置かれる付近の環境を暗室状態にしておく。第14図に示すように、試料DNAの5'末端に導入されるオリゴヌクレオチド47の塩基配列に相補的な20塩基長のオリゴヌクレオチドの合成プライマーを、セル中に緩衝液とともに導入する。セルの設定温度を  $30^\circ\text{C}$  とし、プライマーを試料DNAの5'末端に相補鎖結合させる。続いて、セルの設定温度を  $37^\circ\text{C}$  とし、第16図から第19図に示す4種の化学修飾ヌクレオチドと Sequenase Version 2.0 T7 DNAポリメラーゼ（アマシャム社製）との混合緩衝液をセル中に導入する。この混合緩衝液はゆっくりと一方向にフローさせ続け、試料DNAの環境を常にフレッシュな組成に保る。化学修飾ヌクレオチドの濃度は4種とも  $100 \text{ nM}$ 、ポリメラーゼ濃度は  $100 \text{ unit/l}$  であり、いずれも通常のポリメラーゼ反応の約  $1/1000$  である。アマシャム社より販売されている Sequenase Version 2.0 は極めて高い相補鎖伸長能力があり、伸長速度は  $300$  塩基長/秒以上もある。また、 $100 \text{ nM}$  以下の低いヌクレオチド濃度でも十分な取り込みがみられ、化学修飾ヌクレオチド等のヌクレオチドアナロ

## 2 2

グを非常に良く取り込む。ポリメラーゼはプライマーの次の1塩基を4種の化学修飾ヌクレオチドの中から試料DNAの塩基配列に相補的な塩基を1個だけ取り込ませる。

488nm及び532nmのレーザを1秒間照射し、このレーザ照射に同期させて冷却CCDカメラ34で1秒間露光する。レーザビーム21はセル25内の上表面で全反射し、セルの内部に表面から150nm以下の範囲でエバネッセント照射を誘起する。試料DNAはセル内の上表面から100nm以下の範囲に捕捉されているため、ポリメラーゼ反応で取り込まれた1個の化学修飾ヌクレオチドは励起を受ける。これ以外の化学修飾ヌクレオチドは、ブラウン運動によって激しく動き回っており、仮りに偶然にエバネッセント照射を受けても、検出にかかることはない。冷却CCDカメラ34による検出像を、全視野の51.2×51.2μmについて、第24図に示すように4分割像の第1～第4チャンネル61～64をモニター60に表示する。取り込まれた1個の化学修飾ヌクレオチドの1発光点に対応する第1～第4チャンネルの像（輝点）65, 67, 69, 71を自動認識して検出する。

以降の連続計測では、第24図に示すように、これら4点近傍の領域即ち1発光点の第1～第4チャンネルの像の計測領域66, 68, 70, 72の輝度情報のみをコンピューターに転送し記録し、解析を実行する。4個の輝点65, 67, 69, 71は時間の経過とともに少しずつその位置を変えるが、位置変化する4個の輝点はコンピューターにより自動追尾する。1点からの蛍光発光に対応し像分割されて計測される4個の輝点の蛍光強度の比率は、発光した蛍光体のスペクトル、即ち、蛍光体の種類により明白に変化し、蛍光体の種類が同一であれば4個の輝点の蛍光強度比率は一定である。従って、4個の輝点について計測された蛍光強度の比率から簡単に蛍光体の種類を識別できる。次いで、355nmのパルス発振紫外レーザを10ナノ秒照射する。レーザビームはセル



## 2 3

内の上表面で全反射し、セルの内部に表面から150 nm以下の範囲でエバネッセント照射を誘起する。試料DNAはセル内の上表面から100 nm以下の範囲に捕捉されているため、ポリメラーゼ反応で取り込まれた1個の化学修飾ヌクレオチドは紫外線照射を受け、蛍光体が付加されたケージド物質が、第8図に示すように遊離する。これ以外の化学修飾ヌクレオチドは、ブラウン運動によって激しく動き回っており、仮りに偶然にエバネッセント照射を受けて蛍光体が付加されたケージド物質が遊離しても、遊離したヌクレオチドがポリメラーゼ反応で取り込まれないように、緩衝液は常にフローさせる。続いてポリメラーゼによって、次の化学修飾ヌクレオチドが相補鎖に1個だけ取り込まれる。以降は以下の工程を一定時間間隔で繰り返す。355 nmのパルス発振から0.4秒後に、488 nm及び532 nmのレーザを0.5秒間照射し、これと同期して冷却CCDカメラで0.5秒間露光し、相補鎖伸長で取り込まれた終端の化学修飾ヌクレオチドの蛍光体の種類を識別する。488 nm及び532 nmのレーザ照射終了から0.1秒後に355 nmの紫外レーザをパルス発振させ、相補鎖伸長で取り込まれた終端の化学修飾ヌクレオチドの蛍光体が付加されたケージド物質を遊離させ、次の化学修飾ヌクレオチドを取り込ませる。コンピュータへのデータ転送時間を含む合計1.0秒のサイクルを繰り返す。4点の蛍光強度の情報は露光していない0.5秒の間を利用してコンピュータに転送する。また、4点の蛍光強度の比率から瞬時に蛍光体の種類を識別して塩基種を決定する。この決定結果は、リアルタイムでモニターに出力する。1秒間当り1塩基を決定するサイクルを繰り返し、48502塩基長のλ DNAの全塩基配列決定を48502秒、即ち、約13.5時間で終了できる。(実施例2)

大規模に同時に10種のDNA試料の塩基配列決定を実行する例を説明する。10種の100 k塩基長のDNA試料に各々独立に、両末端に

## 24

各々既知の塩基配列の合成オリゴヌクレオチドをライゲーションにより導入し、実施例1と同様の方法で3'末端にビオチンを導入する。5'末端側には50塩基長の既知の塩基配列を導入するが、その塩基配列は10種のDNA試料により変化させる。一方、直径約1 $\mu$ mの磁気帯性ポリスチレンビーズの外表面にストレプトアビジンを酸アミド結合により導入する。ライゲーションさせた各DNA試料を1本鎖状態に変性し、この磁気ビーズを加え、各DNA試料の3'末端に磁気ビーズを結合させる。計測は実施例1と同様の装置を用いて実行する。次に説明するように、セルの内下表面に10種の1本鎖合成オリゴヌクレオチドを局所的に結合させる。顕微鏡の視野となる51.2 $\times$ 51.2 $\mu$ mの範囲のセルのガラス表面に、第25図に示すように、第1～第10の試料DNAを補足する10箇所の微小な試料補足領域73～82の各々に、第1～第10の各試料DNAの5'末端に導入される既知の塩基配列と相補的な50塩基長の1本鎖合成オリゴヌクレオチド83～92を結合する。各試料補足領域は1 $\times$ 1 $\mu$ mの大きさで、5 $\mu$ m間隔で直線状に並べてある。5'末端に試料の種類毎に異なる塩基配列をもち、3'末端に磁気ビーズを各々導入した第1～第10の試料DNAを、混合状態でセル中に導入する。セル温度は25 $^{\circ}$ Cに設定し、各試料DNAを各々相補的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチドと相補鎖結合させる。相補鎖結合しなかった試料DNAは緩衝液をフローさせて視野から排除する。各試料補足領域に1本～数本の試料DNAが結合する。次に水平方向に磁場を印加し、試料DNAの3'末端に結合した磁気ビーズに静磁力を作用させ、第26図に示すように、第1～第10の試料DNA93～102を引き伸ばす。引き伸ばす力は磁場の大きさを変化させて制御する。100K塩基長のDNA試料は引き伸ばすと約34 $\mu$ mの長さになり、試料DNAの3'末端側は視野の51.2 $\mu$ mに収まる。

セルの設定温度を65 $^{\circ}$ Cとするが、試料DNAとセルに結合するオリ

ゴヌクレオチドの相補鎖結合は50塩基長と長いため、65℃においても相補鎖結合が保たれる。第27図から第30図に示す4種の化学修飾ヌクレオチド（但し、蛍光体は略称で示す）とAmpliTaq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）との混合緩衝液をセル中に導入する。第21図に示す化学修飾ヌクレオチドでは、第16図から第19図に示す化学修飾ヌクレオチドと異なり、蛍光体が付加されたケージド物質のヌクレオチドへの標識位置を、塩基からリボースの炭素3'の位置に変更してあるが、第16図から第19図に示す化学修飾ヌクレオチドを用いる場合と同様に、ポリメラーゼによって相補鎖に取り込まれ得る。しかも、紫外線照射により、第1図の光反応に従って蛍光体が付加されたケージド物質が解離すると、ヌクレオチドは未修飾の状態と等価になる。第27図から第30図に示す4種の化学修飾ヌクレオチドは、第16図から第19図に示す化学修飾ヌクレオチドと同様の有機合成により調製できる。第27図から第30図は、各々、Cy3.0, Cy3.5, Cy5.0, Cy5.5 (Biological Detection System, Inc. 製) で標識されたケージドdATP, ケージドdCTP, ケージドdGTP, ケージドdTTPである。これらを含む混合緩衝液をゆっくりと一方向にフローさせ続け、試料DNAの環境を常にフレッシュな組成に保つ。ポリメラーゼはセルに結合したオリゴヌクレオチドをプライマーとして相補鎖伸長反応を実行する。後の連続する蛍光計測は以下の点を除いて実施例1と同様である。

蛍光励起レーザーは532nmのYAGレーザー(20mW)と633nmのHe-Neレーザー(20mW)とを用いる。また、4つの像に対応する干渉フィルターは、各々、540~580nm, 580~620nm, 650~680nm, 680~730nmで透過率70%以上の透過帯を持ち、300~1100nmの範囲でこれら透過帯以外での透過率は $10^{-4}$ 以下とする。また、レーザー波長である355nm, 532nm

## 26

m, 633 nmの透過率は $10^{-6}$ 以下とする。セル内の上表面に金属薄膜を蒸着しておき、レーザ光の全反射によって金属内にプラズマ波を励起し、セル内に表面プラズモンによる近接場光を発生させる。この近接場光は、エバネッセント照射を用いる方法によりも更に微小領域を高強度で照射でき、より高感度な蛍光計測により単分子計測を実現できる。

試料DNA分子を表面プラズモン共鳴による近接場光で照射するため、連続する計測の1サイクル1.0秒の工程の中で、532 nmと633 nmのレーザ照射時間帯、355 nmのレーザ照射時間帯、及びそれらの時間帯の合計0.7秒間には、セル中に下から上に向かう方向に電場を印加して、試料DNAをセル内の上表面に引き付ける。残る0.3秒間には、電場を逆方向に印加して、試料DNAをセル内の上表面から浮かせ、次の化学修飾ヌクレオチドを取り込ませやすくする。また、視野内の計測ポイントが10試料に対応して10点、検出像においては4分割されて40点になるが、これら40点を検出像で追尾しつつ蛍光強度を逐次記録、解析する。10種の試料DNAは、第26図に示すように、完全に空間的に分離されているので、独立計測できる。試料DNAによっては複数分子が捕捉されているため、複数の分子からの蛍光が検出されるが、常に同一の蛍光体からの蛍光が検出されるので、計測上は蛍光強度が増大するだけであり、問題は全くない。以上の連続する計測を続けて、1試料につき1秒間に1塩基決定し、100 k塩基長の10種の試料の全塩基配列、合計1 M塩基長を、100 k秒、即ち、約1日間で決定できる。

## (実施例3)

本実施例では細胞中のmRNAの分布計測を実行する。特定の種類の細胞に発現している約1万種のmRNAを抽出し、蛍光顕微鏡下に設置された蛍光セル中に導入する。本実施例で用いる計測装置では、実施例2で用いる計測装置を以下の点で変更している。励起レーザを532 n

## 27

mのYAGレーザと633nmのHe-Neレーザの2本から488nmのArイオンレーザの1本とする。4分割プリズムと組み合わせる4種の干渉フィルターは、各々、500~540nm, 540~570nm, 570~590nm, 590~630nmで透過率70%以上の透過帯を持ち、300~1100nmの範囲でこれら透過帯以外での透過率は $10^{-4}$ 以下とする。また、レーザ波長である355nm, 488nmの透過率は $10^{-6}$ 以下とする。第31図から第34図に示す構造を持つ化学修飾ヌクレオチドを用いるが、第27図から第30図に示す化学修飾ヌクレオチドと異なり、1個のヌクレオチドに2個の蛍光体を標識している。第31図から第34図は、各々、ケージドdATP, ケージドdCTP, ケージドdGTP, ケージドdTTPであり、リボースの炭素3'の位置に結合したニトロフェニル基の炭素3の位置に各々、FAM, JOE, TAMRA, ROX (Applied Biosystems社製)を標識し、ニトロフェニル基の炭素5の位置にはいずれもFAMを標識している。同一ヌクレオチド内部の、FAMとJOE, FAMとTAMRA, FAMとROXの間でエネルギー移動を引き起こさせる。これにより、488nmのArイオンレーザによってFAMだけでなく、JOE, TAMRA, ROXを高効率で励起できる。いずれの蛍光体もヌクレオチドにニトロフェニル基を介して結合しており、355nmの紫外パルスレーザの照射によってヌクレオチドから遊離する。未修飾ヌクレオチド等の不純物はカラム等で取り除いておく。

対物レンズは油浸の100倍から60倍(オリンパス社製, プラン・アポクロマート×60, 1.40NA)とする。カメラの直前の撮影レンズは2.5倍から1.67倍(オリンパス社製, NFK×1.67)とする。用いた冷却型2次元CCDカメラは検出面の大きさは35.8×35.8mmで、35×35 $\mu$ mの大きさの1画素が1024×1024画素並んで構成されている。結像面での像倍率は60×1.67で

## 28

100倍なので、1画素は $0.35 \times 0.35 \mu\text{m}$ に対応する。光路に挿入された4分割プリズムにより、 $179 \times 179 \mu\text{m}$ の視野の像が4つの像に分割され、 $17.9 \times 17.9 \text{ mm}$ の大きさの分割され4つの像が、第13図と同様にして、検出面で互いに重なり合わないようにして $35.8 \times 35.8 \text{ mm}$ の大きさで結像される。 $488 \text{ nm}$ 、 $355 \text{ nm}$ のレーザの顕微鏡の視野内への照射強度とその均一性を高めるために、第35図に示すように、レーザ照射をプリズム内部で繰り返し全反射させる多重反射法を用いる。第36図に示すように、光ファイバー103にレーザを導入し、ファイバー内部で繰り返し全反射させ、ファイバーの外表面近傍の近接場光を利用して計測しても良い。ファイバーを多数本束ねて同時計測すれば計測面積を拡大できる。FAMを標識したポリTからなる1本鎖合成オリゴヌクレオチドの5'末端を、顕微鏡の視野内のセルの内下表面に、 $10 \times 10 \mu\text{m}$ の面積に平均1個の割合でほぼ均一に結合させる。視野内の結合位置は $488 \text{ nm}$ のレーザ照射により蛍光発光スポットとして確認できる。視野内の発光点の数、即ち、ポリTの結合数は約330個である。各発光点は互いに空間的に分離されて検出でき、その蛍光を独立に計測できる。330個の発光点の4分割像の検出面上での1320個の座標を記録し、以降の蛍光計測の測定点とする。高出力の $488 \text{ nm}$ のレーザ光を連続的に照射して、標識FAMを分解させ退色させる。

セル内に導入されたmRNAはポリA部を有するため、このポリA部が固定されたポリTと相補鎖結合する。この相補鎖結合は全くランダムに生じるため、同時に計測できる視野内の330個のポリTと相補鎖結合したmRNAの組成は、細胞中での発現頻度、分布を反映している。従って、結合した330個のmRNAの同定ができれば、細胞中でどのようなmRNAがどれだけ発現しているかを調べることができる。本実施例ではこの同定を、各mRNAの塩基配列を直接決定し、既存のデー

データベースを参照して実現する。ポリ T をプライマーとし、逆転写酵素による cDNA 伸長反応を実行する際、基質に第 31 図から第 34 図に示す化学修飾ヌクレオチドを用いて、実施例 2 と同様の方法で、mRNA を鋳型とした直接の塩基配列決定を実行する。もちろん、予め cDNA を合成し、これを鋳型として塩基配列決定を実行しても良い。mRNA は 1 k 塩基から数 k 塩基の間で、引き伸ばしたときの長さは 1  $\mu$ m 以下である。従って、相補鎖伸長反応の際、330 個の発光点は平均 10  $\mu$ m 以上離れているので、互いに重なったり干渉することはない。ポリ A とポリ T の相補鎖結合の相対的位置関係、即ち、相補鎖伸長反応のプライミング位置は 330 個の計測位置によってランダムに異なる。しかし、各計測位置から得られる信号は mRNA の単分子からの情報なので、このプライミングサイトの不確定さは問題にならない。このことは単分子を用いる塩基配列決定法の大きなメリットである。330 種の mRNA の塩基配列を 1 秒間に 1 塩基のスピードで解読し、30 分以内でほぼこれらの全長の塩基配列を決定できる。得られた塩基配列情報を既存のデータベースと比較し、どのようなタンパク質をコードする遺伝子であるかを同定すると同時に、それらの度数分布を表示する。330 という数はサンプリング数として十分と考えられるが、必要ならば上記の計測を繰り返してサンプリング数を増やせば良い。

本実施例ではプライマーとしてセルに固定されたポリ T を用いたが、4 種の塩基（アデニン、シトシン、グアニン、チミン）の何れとも相補鎖結合し得るイノシン、3-ニトロピロール、5-ニトロインドール等の塩基を含むオリゴヌクレオチドをプライマーとしても良い。この様なオリゴヌクレオチドは、鋳型核酸の任意の位置に相補結合しこの位置を起点とする相補鎖伸長を行なう。ポリ T をプライマーとして用いる場合と同様に、この起点の不確定さは、塩基配列情報を鋳型核酸単分子から得る本実施例では問題とならない。また本実施例では、mRNA の塩基





## 30

配列決定について述べたが、単にmRNA分布計測を行なう場合は数十塩基又は数十塩基以下の塩基配列決定を行なうだけで十分である。データベースに登録されていない塩基配列が得られる時には、それは即ち新しい遺伝子の発見である。以上説明した各実施例の他に、本発明の方法では、ポリメラーゼや他の様々な酵素の働きを素反応から研究でき、生化学、分子生物学、生物物理学、医学等へ多大に貢献できる。例えば、ポリメラーゼ相補鎖合成伸長反応の素反応、即ち、ヌクレオチド、又は化学修飾されたヌクレオチドが取り込まれる反応速度の計測ができ、取り込まれる反応速度がヌクレオチドの種類によりどのように変化するか、あるいは取り込まれる反応速度が化学修飾されたヌクレオチドの化学修飾体の種類によりどのように変化するか、さらにこれらの反応速度が相補鎖合成伸長反応に用いるポリメラーゼの種類によりどのように変化するか等を、詳細に高い時間分解能で得られる。

本発明によれば、数100K塩基以上の単一DNA分子の塩基配列決定ができ、従来非常に効率が悪く時間と労力を要した大規模なDNAの塩基配列決定が高速かつ容易にでき、塩基配列決定前の前処理が大幅に簡略化できる。

## 請 求 の 範 囲

1. 少なくとも一部が1本鎖である鋳型核酸(7, 44, 45, 93~102)の一部にオリゴヌクレオチド(8, 83~92)を相補鎖結合させ、前記オリゴヌクレオチドを起点として相補鎖合成伸長反応(10)を行ない、前記鋳型核酸の核酸塩基配列の決定を行なう核酸塩基配列決定法において、(a)前記鋳型核酸の1本鎖の部分に前記オリゴヌクレオチドを結合する工程と、(b)前記相補鎖合成伸長反応が連続して進行しないように化学修飾された化学修飾ヌクレオチド(9)の1個を、前記鋳型核酸の1本鎖に相補鎖結合させる工程と、(c)前記相補鎖合成伸長反応の進行を可能とする状態にするために、前記鋳型核酸に結合していない前記化学修飾ヌクレオチドが共存した状態で、前記鋳型核酸に結合したヌクレオチドの化学構造を変化させる化学反応を行なう工程と、(d)前記工程(b)、及び前記工程(c)を繰り返す工程とを有し、前記鋳型核酸の1本鎖に結合した前記化学修飾ヌクレオチドの化学構造の変化を制御して、前記核酸鋳型の塩基配列を1塩基毎に順次決定することを特徴とする核酸塩基配列決定法。
2. 請求の範囲第1項記載の核酸塩基配列決定法において、前記工程(c)における前記化学構造の変化を光反応により行なうことを特徴とする核酸塩基配列決定法。
3. 請求の範囲第1項記載の核酸塩基配列決定方法において、前記化学修飾ヌクレオチドがケージド化合物であることを特徴とする核酸塩基配列決定法。
4. 請求の範囲第1項記載の核酸塩基配列決定法において、前記化学修飾ヌクレオチドが2-ニトロベンジル誘導体であることを特徴とする核酸塩基配列決定法。
5. 請求の範囲第1項記載の核酸塩基配列決定法において、前記化学

## 3 2

修飾ヌクレオチドがリボースの炭素 3 の位置で少なくとも化学修飾された化学修飾ヌクレオチドであることを特徴とする核酸塩基配列決定法。

6. 請求の範囲第 1 項記載の核酸塩基配列決定法において、前記化学修飾ヌクレオチドが塩基の位置で少なくとも化学修飾された化学修飾ヌクレオチドであることを特徴とする核酸塩基配列決定法。

7. 請求の範囲第 1 項記載の核酸塩基配列決定法において、前記化学修飾ヌクレオチドに少なくとも 1 個の蛍光体が結合していることを特徴とする核酸塩基配列決定法。

8. 請求の範囲第 1 項記載の核酸塩基配列決定法において、前記化学修飾ヌクレオチドに少なくとも 1 個の蛍光体が結合しており、前記蛍光体が前記化学修飾ヌクレオチドの塩基種毎に異なることを特徴とする核酸塩基配列決定法。

9. 請求の範囲第 1 項記載の核酸塩基配列決定方法において、前記化学修飾ヌクレオチドに少なくとも 1 個の蛍光体が結合しており、少なくとも 1 個の前記蛍光体を、前記化学反応により前記化学修飾ヌクレオチドから遊離させることを特徴とする核酸塩基配列決定方法。

10. 少なくとも一部が 1 本鎖である鋳型核酸（7, 44, 45, 93～102）の一部にオリゴヌクレオチド（8, 83～92）を相補鎖結合させ、前記オリゴヌクレオチドを起点として相補鎖合成伸長反応（10）を行ない、ポリメラーゼ相補鎖合成伸長反応の反応速度を計測する計測方法において、（a）前記鋳型核酸の 1 本鎖の部分にオリゴヌクレオチドを結合する工程と、（b）前記相補鎖合成伸長反応が連続して進行しないように化学修飾された化学修飾ヌクレオチド（9）の 1 個を、前記鋳型核酸の 1 本鎖に相補鎖結合させる工程と、（c）前記相補鎖合成伸長反応の進行を可能とする状態にするために、前記鋳型核酸に結合していない前記化学修飾ヌクレオチドが共存した状態で、前記鋳型核酸に結合したヌクレオチドの化学構造を変化させる光化学反応を行な

## 3 3

う工程と、(d) 前記工程 (b)、及び前記工程 (c) を繰り返す工程とを有し、前記鋳型核酸の 1 本鎖に結合した前記化学修飾ヌクレオチドの化学構造の変化を制御して、ポリメラーゼ相補鎖合成伸長反応の反応速度を計測することを特徴とするポリメラーゼ相補鎖合成伸長反応の反応速度を計測する計測方法。

1 1. 少なくとも一部が 1 本鎖である鋳型核酸 (7, 44, 45, 93 ~ 102) の一部にオリゴヌクレオチド (8, 83 ~ 92) を相補鎖結合させ、前記オリゴヌクレオチドを起点として相補鎖合成伸長反応 (10) を行ない、前記鋳型核酸の核酸塩基配列の決定を行なう核酸塩基配列決定法において、(a) 前記鋳型核酸の 1 本鎖の部分に前記オリゴヌクレオチドを結合する工程と、(b) 前記相補鎖合成伸長反応が連続して進行しないように 4 種類のヌクレオチドが化学修飾された化学修飾ヌクレオチド (9) の 1 個を、前記鋳型核酸の 1 本鎖に相補鎖結合させる工程と、(c) 前記相補鎖合成伸長反応の進行を可能とする状態にするために、前記鋳型核酸に結合していない前記化学修飾ヌクレオチドが共存した状態で、前記鋳型核酸に結合したヌクレオチドの化学構造を変化させる光化学反応を行なう工程と、(d) 前記工程 (b)、及び前記工程 (c) を繰り返す工程とを有し、前記鋳型核酸の 1 本鎖に結合した前記化学修飾ヌクレオチドの化学構造を変化を制御して、前記核酸鋳型の塩基配列を 1 塩基毎に順次決定することを特徴とする核酸塩基配列決定法。

1 2. (a) 鋳型核酸の 1 本鎖 (7, 44, 45, 93 ~ 102) に蛍光標識が付加したケージドヌクレオチド (9) の 1 個を結合させる工程と、(b) レーザ照射 (1, 21) により前記蛍光標識を励起し、発光した蛍光を計測して塩基種を判定する工程、(c) 前記鋳型核酸に結合していない前記ケージドヌクレオチドが共存した状態で、紫外線照射 (2) により前記蛍光標識を前記鋳型核酸に結合した前記ケージドヌク

## 3 4

レオチドから遊離させる工程と、(d) 前記工程 (a) から前記 (c) を繰り返して、前記蛍光標識が付加したケージドヌクレオチドを順次 1 個ずつ前記鋳型核酸に結合させた後、前記蛍光標識を遊離させて、前記核酸鋳型の塩基配列を 1 塩基毎に順次決定することを特徴とする核酸塩基配列決定法。

1 3. (a) 鋳型核酸の 1 本鎖 (7, 4 4, 4 5, 9 3 ~ 1 0 2) に化学修飾された化学修飾ヌクレオチド (9) の 1 個を結合する工程と、(b) 結合した前記化学修飾ヌクレオチドを検出する工程と、(c) 前記鋳型核酸に結合していない前記化学修飾ヌクレオチドが共存した状態で、前記化学修飾を前記鋳型核酸に結合した前記化学修飾ヌクレオチドから遊離させる工程と、(d) 前記工程 (a) から前記 (c) を繰り返して、前記化学修飾ヌクレオチドを順次 1 個ずつ前記鋳型核酸に結合した後、前記化学修飾を遊離させて、前記核酸鋳型の塩基配列を 1 塩基毎に順次決定することを特徴とする核酸塩基配列決定法。

1 4. 請求の範囲第 1 3 項記載の核酸塩基配列決定法において、前記化学修飾ヌクレオチドが蛍光標識が付加したケージドヌクレオチドであることを特徴とする核酸塩基配列決定法。

1 5. 化学修飾された化学修飾ヌクレオチド (9) の 1 個を鋳型核酸 (7, 4 4, 4 5, 9 3 ~ 1 0 2) の 1 本鎖に結合すること、及び、前記鋳型核酸に結合していない前記化学修飾ヌクレオチドが共存した状態で、前記化学修飾を前記鋳型核酸に結合した前記化学修飾ヌクレオチドから遊離させる制御を行ない、前記核酸鋳型の塩基配列を 1 塩基毎に順次決定することを特徴とする核酸塩基配列決定法。

1 6. 請求の範囲第 1 5 項記載の核酸塩基配列決定法において、前記化学修飾ヌクレオチドが蛍光標識が付加したケージドヌクレオチドであることを特徴とする核酸塩基配列決定法。

1 7. 少なくとも一部が 1 本鎖である鋳型核酸 (7, 4 4, 4 5, 9

3～102)の一部にオリゴヌクレオチド(8, 83～92)を相補鎖結合させ、前記オリゴヌクレオチドを起点として相補鎖合成伸長反応(10)を行ない、前記鋳型核酸の核酸塩基配列の決定を行なう核酸塩基配列決定装置において、前記鋳型核酸の1本鎖の部分に前記オリゴヌクレオチドを結合した後に、前記鋳型核酸の1本鎖に相補鎖結合させた、前記相補鎖合成伸長反応が連続して進行しないように化学修飾された1個の化学修飾ヌクレオチド(9)を検出するための、前記化学修飾ヌクレオチドに標識された蛍光体を励起するレーザ(1, 15, 16)と、前記蛍光体から発する蛍光を集光するレンズ(27)、前記蛍光の波長を選択するフィルター(32)、前記蛍光を検出する光検出器(34)を具備し、前記蛍光を検出する蛍光顕微鏡と、前記光検出器の出力から前記化学修飾ヌクレオチドの塩基種を識別する解析手段と、前記相補鎖合成伸長反応の進行を可能とする状態にするために、前記鋳型核酸に結合していない前記化学修飾ヌクレオチドが共存した状態で、前記鋳型核酸に結合した化学修飾ヌクレオチドの化学構造の変化を光化学反応により生成させるための光源(17)とを有し、前記化学修飾ヌクレオチドの1個を前記鋳型核酸の1本鎖に相補鎖結合させること、前記鋳型核酸に結合した化学修飾ヌクレオチドの化学構造を変化させことを繰り返し、前記鋳型核酸の1本鎖に結合した前記化学修飾ヌクレオチドの化学構造の変化を制御して、前記核酸鋳型の塩基配列を1塩基毎に順次決定することを特徴とする核酸塩基配列決定装置。

18. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、前記レーザをエバネッセント照射することを特徴とする核酸塩基配列決定装置。

19. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、前記レーザを表面プラズモン共鳴照射することを特徴とする核酸塩基配列決定装置。

## 35

3～102)の一部にオリゴヌクレオチド(8, 83～92)を相補鎖結合させ、前記オリゴヌクレオチドを起点として相補鎖合成伸長反応(10)を行ない、前記鋳型核酸の核酸塩基配列の決定を行なう核酸塩基配列決定装置において、前記鋳型核酸の1本鎖の部分に前記オリゴヌクレオチドを結合した後に、前記鋳型核酸の1本鎖に相補鎖結合させた、前記相補鎖合成伸長反応が連続して進行しないように化学修飾された1個の化学修飾ヌクレオチド(9)を検出するための、前記化学修飾ヌクレオチドに標識された蛍光体を励起するレーザ(1, 15, 16)と、前記蛍光体から発する蛍光を集光するレンズ(27)、前記蛍光の波長を選択するフィルター(32)、前記蛍光を検出する光検出器(34)を具備し、前記蛍光を検出する蛍光顕微鏡と、前記光検出器の出力から前記化学修飾ヌクレオチドの塩基種を識別する解析手段と、前記相補鎖合成伸長反応の進行を可能とする状態にするために、前記鋳型核酸に結合していない前記化学修飾ヌクレオチドが共存した状態で、前記鋳型核酸に結合した化学修飾ヌクレオチドの化学構造の変化を光化学反応により生成させるための光源(17)とを有し、前記化学修飾ヌクレオチドの1個を前記鋳型核酸の1本鎖に相補鎖結合させること、前記鋳型核酸に結合した化学修飾ヌクレオチドの化学構造を変化させことを繰り返し、前記鋳型核酸の1本鎖に結合した前記化学修飾ヌクレオチドの化学構造の変化を制御して、前記核酸鋳型の塩基配列を1塩基毎に順次決定することを特徴とする核酸塩基配列決定装置。

18. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、前記レーザをエバネッセント照射することを特徴とする核酸塩基配列決定装置。

19. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、前記レーザを表面プラズモン共鳴照射することを特徴とする核酸塩基配列決定装置。

## 36

20. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、前記化学反応のための光源が紫外光、又は紫外レーザを発することを特徴とする核酸塩基配列決定装置。
21. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、前記光化学反応のための光をエバネッセント照射することを特徴とする核酸塩基配列決定装置。
22. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、前記光化学反応のための光を表面プラズモン共鳴照射することを特徴とする核酸塩基配列決定装置。
23. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、複数種類の前記鋳型核酸の各々を前記蛍光顕微鏡の視野内の異なる位置に保持し得る手段を有し、複数種類の前記鋳型核酸の各々の塩基配列を同時に決定することを特徴とする核酸塩基配列決定装置。
24. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、前記鋳型核酸の異なる部位の塩基配列を同時に決定することを特徴とする核酸塩基配列決定装置。
25. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、前記鋳型核酸を固相担体に保持することを特徴とする核酸塩基配列決定装置。
26. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、前記鋳型核酸の複数の箇所を固相担体へ結合することを特徴とする核酸塩基配列決定装置。
27. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、前記鋳型核酸をビーズ(5, 6, 52, 53)に保持することを特徴とする核酸塩基配列決定装置。
28. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、前記鋳型核酸をビーズ(5, 6, 52, 53)に保持し、レーザによる光トラップにより前記ビーズを保持することを特徴とする核酸塩基配列決



定装置。

29. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、前記鋳型核酸が磁性を帯びたビーズ(6, 53)に保持され、前記ビーズが磁力により保持されることを特徴とする核酸塩基配列決定装置。

30. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、前記鋳型核酸が、予め固相担体に結合されたオリゴヌクレオチドとの相補鎖結合により結合されることを特徴とする核酸塩基配列決定装置。

31. 請求の範囲第17項記載の核酸塩基配列決定装置において、前記鋳型核酸が固相担体へ静電気力により接合されることを特徴とする核酸塩基配列決定装置。

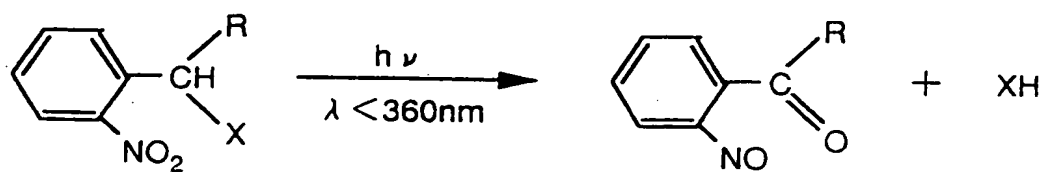
32. 少なくとも一部が1本鎖である鋳型核酸(7, 93~102)の一部にオリゴヌクレオチド(8, 83~92)を相補鎖結合させ、前記オリゴヌクレオチドを起点として相補鎖合成伸長反応(10)を行ない、ポリメラーゼ相補鎖合成伸長反応の反応速度を計測する計測装置において、前記鋳型核酸の1本鎖の部分にオリゴヌクレオチドを結合した後、前記鋳型核酸の1本鎖に相補鎖結合させた、前記相補鎖合成伸長反応が連続して進行しないように化学修飾された1個の化学修飾ヌクレオチド(9)を検出するための、前記化学修飾ヌクレオチドに標識された蛍光体を励起するレーザ(15, 16)と、前記蛍光体から発する蛍光を集光するレンズ(27)、前記蛍光の波長を選択するフィルター(32)、前記蛍光を検出する光検出器(34)を具備し、前記蛍光を検出する蛍光顕微鏡と、前記光検出器の出力から前記化学修飾ヌクレオチドの塩基種を識別する解析手段と、前記相補鎖合成伸長反応の進行を可能とする状態にするために、前記鋳型核酸に結合していない前記化学修飾ヌクレオチドが共存した状態で、前記鋳型核酸に結合した化学修飾ヌクレオチドの化学構造の変化を光化学反応により生成させるための光源(17)とを有し、前記化学修飾ヌクレオチドの1個を前記鋳型核酸

## 38

の1本鎖に相補鎖結合させること、前記鋳型核酸に結合した化学修飾ヌクレオチドの化学構造を変化させことを繰り返し、前記鋳型核酸の1本鎖に結合した前記化学修飾ヌクレオチドの化学構造の変化を制御して、ポリメラーゼ相補鎖合成伸長反応の反応速度を計測することを特徴とする計測装置。

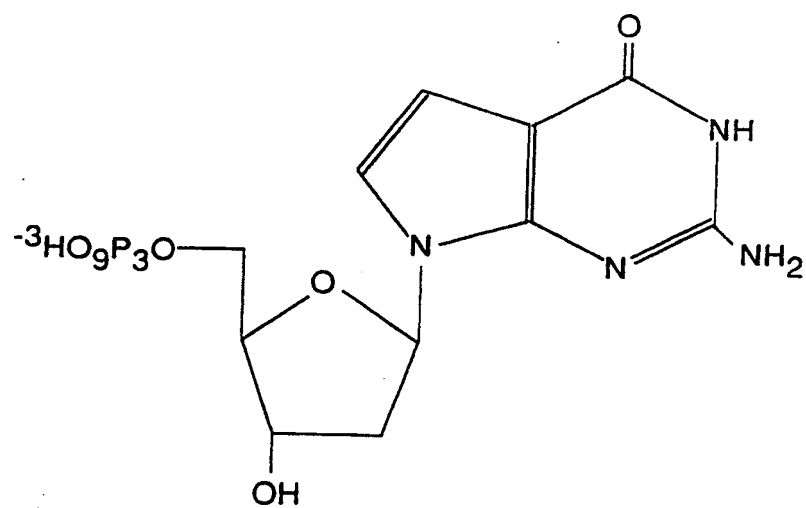
1/36

## 第1図



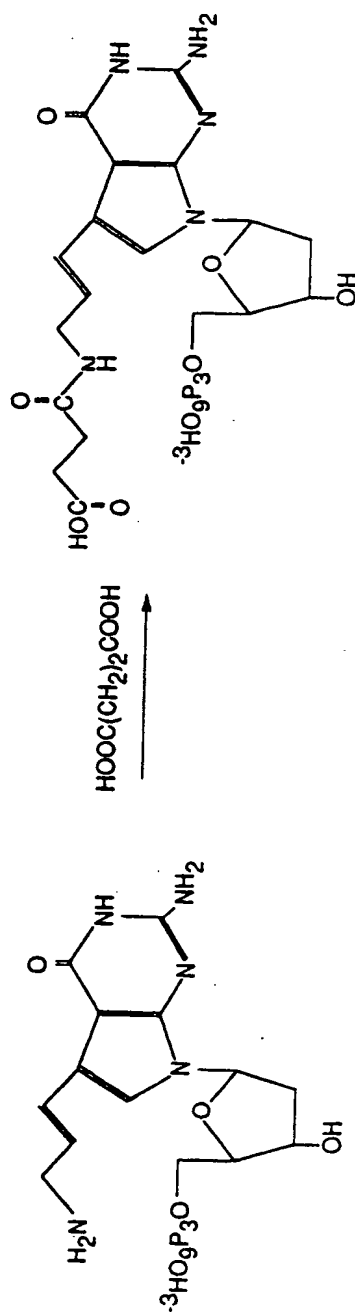
2/36

## 第2図



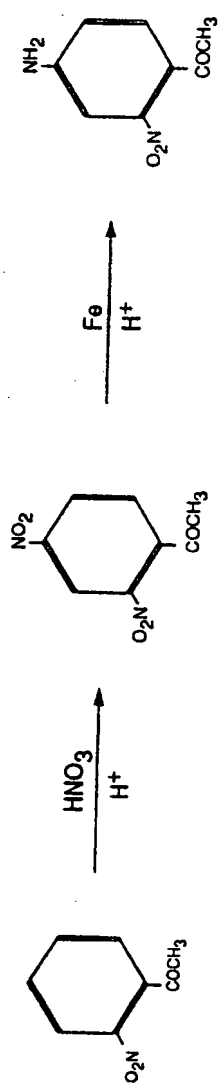
3/36

## 第3図



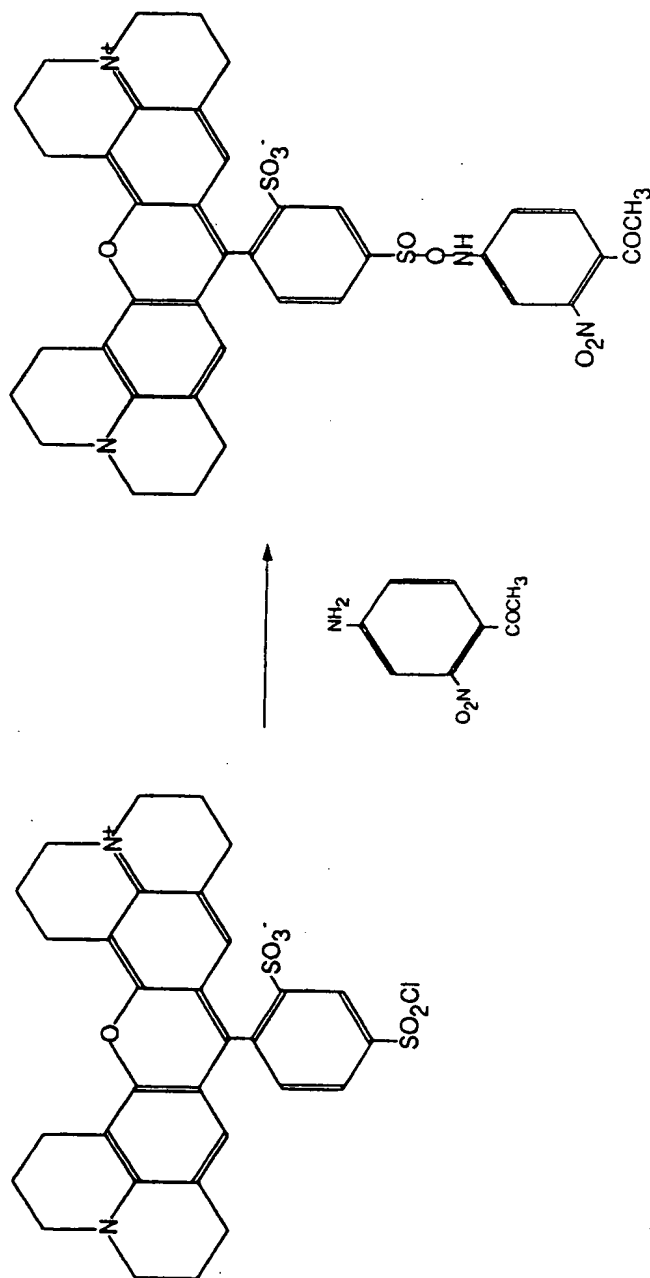
4/36

## 第4図



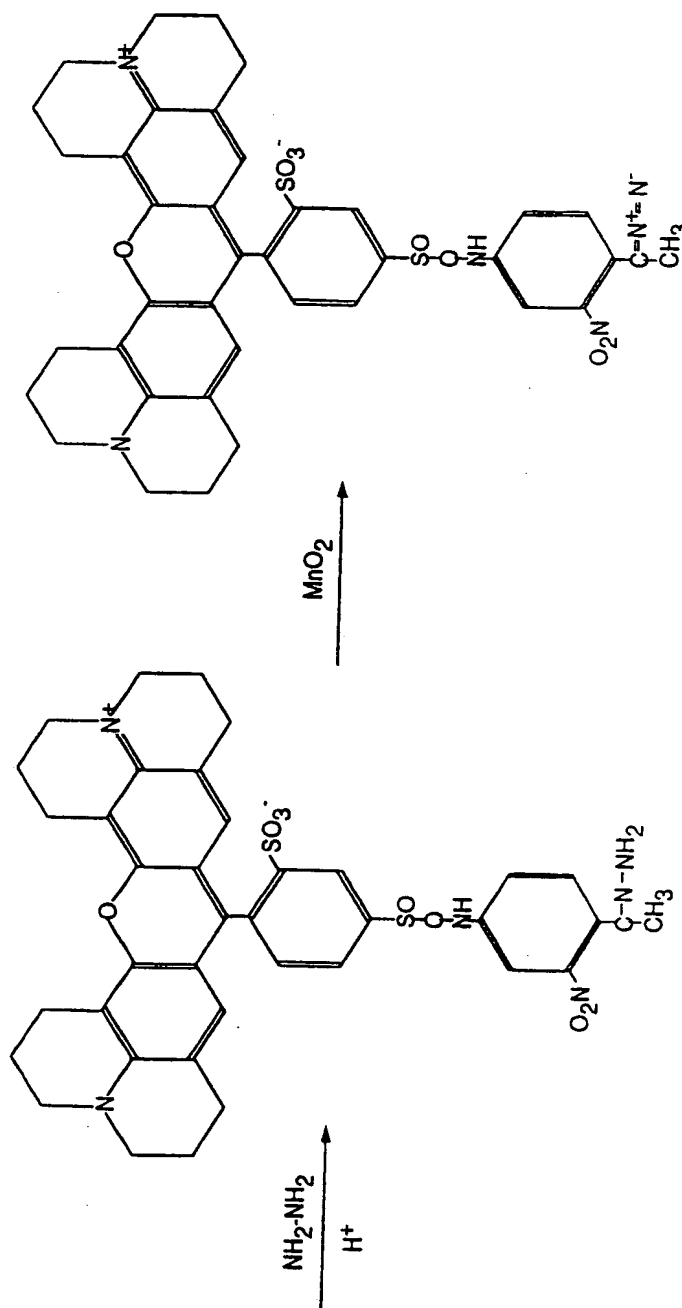
5/36

## 第5図



6/36

第6図

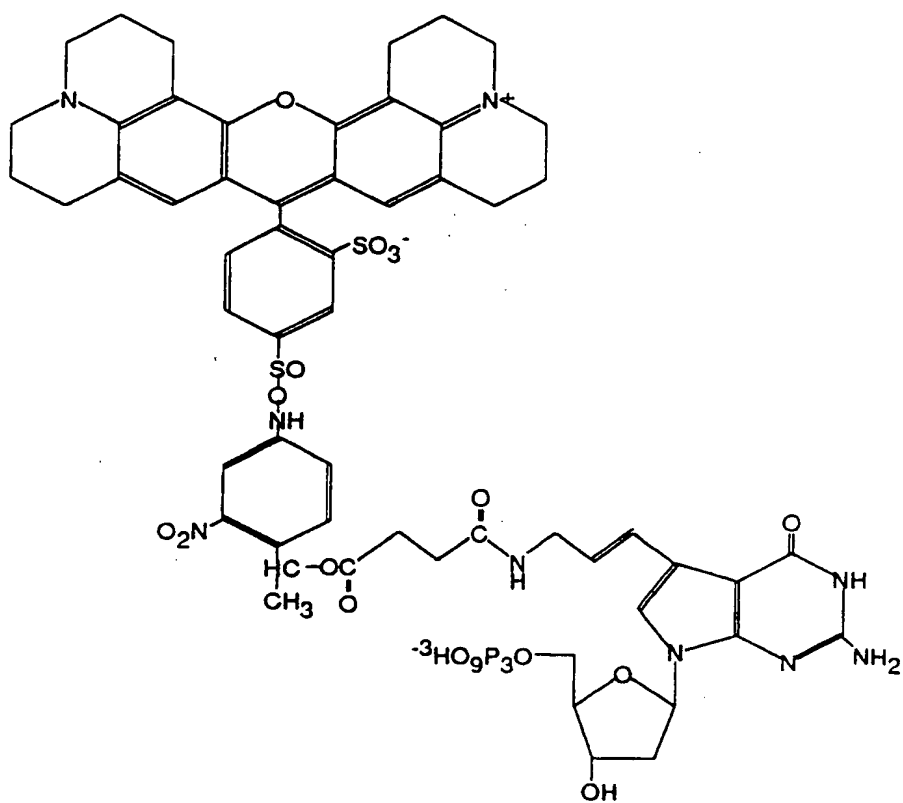


(第5図)



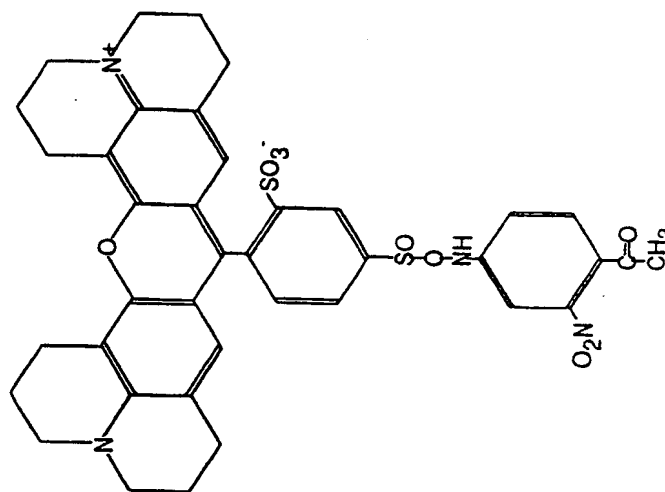
7/36

## 第7図

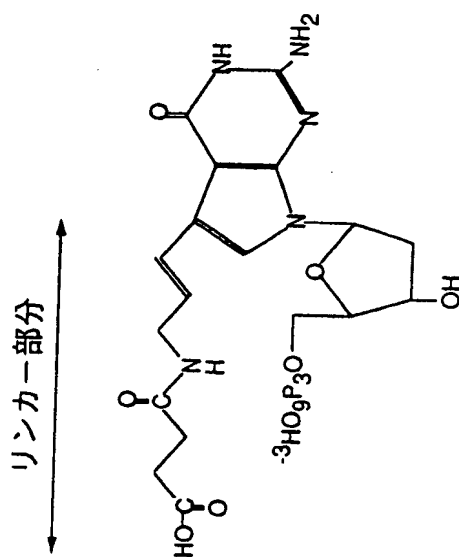


8/36

## 第8図

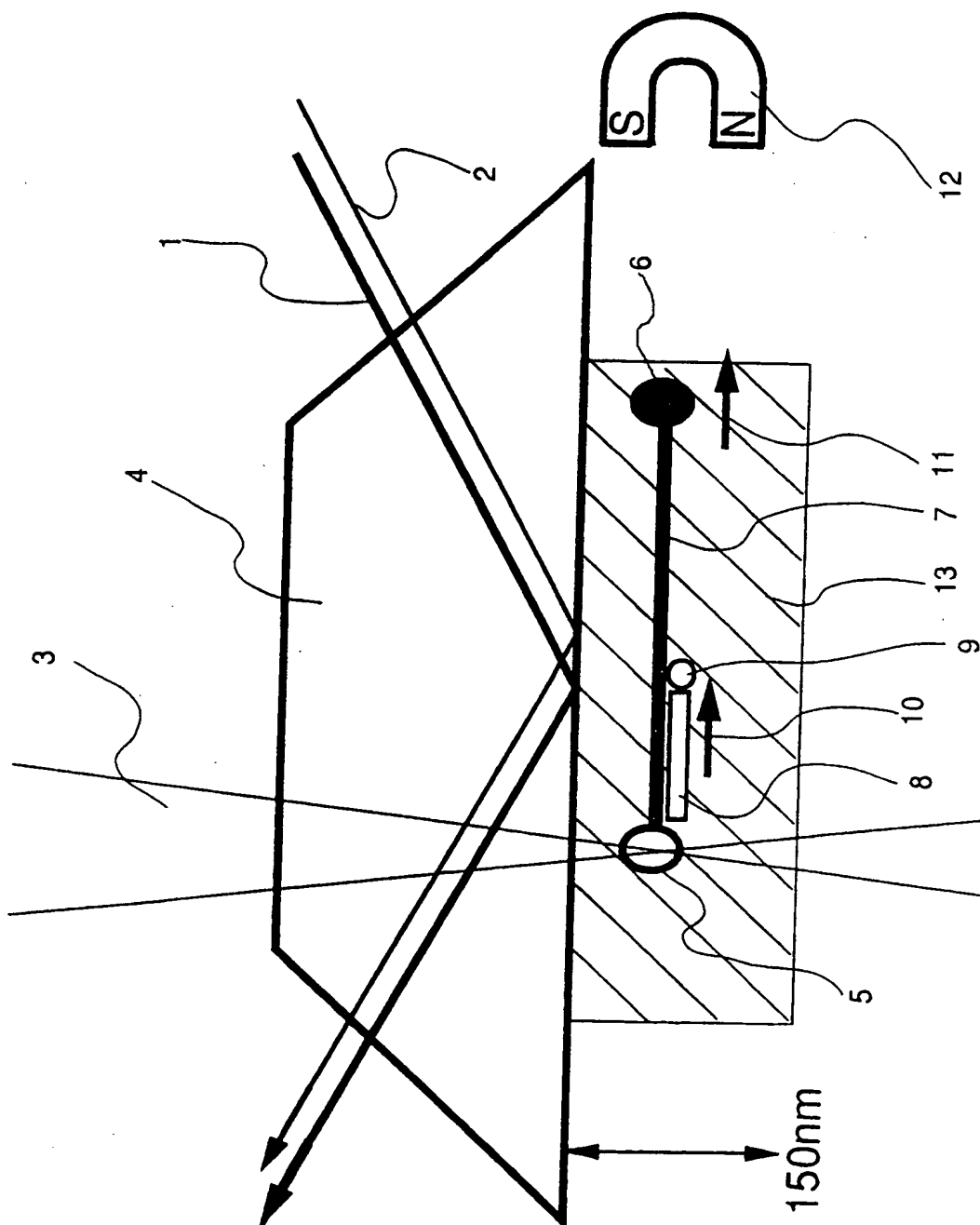


+



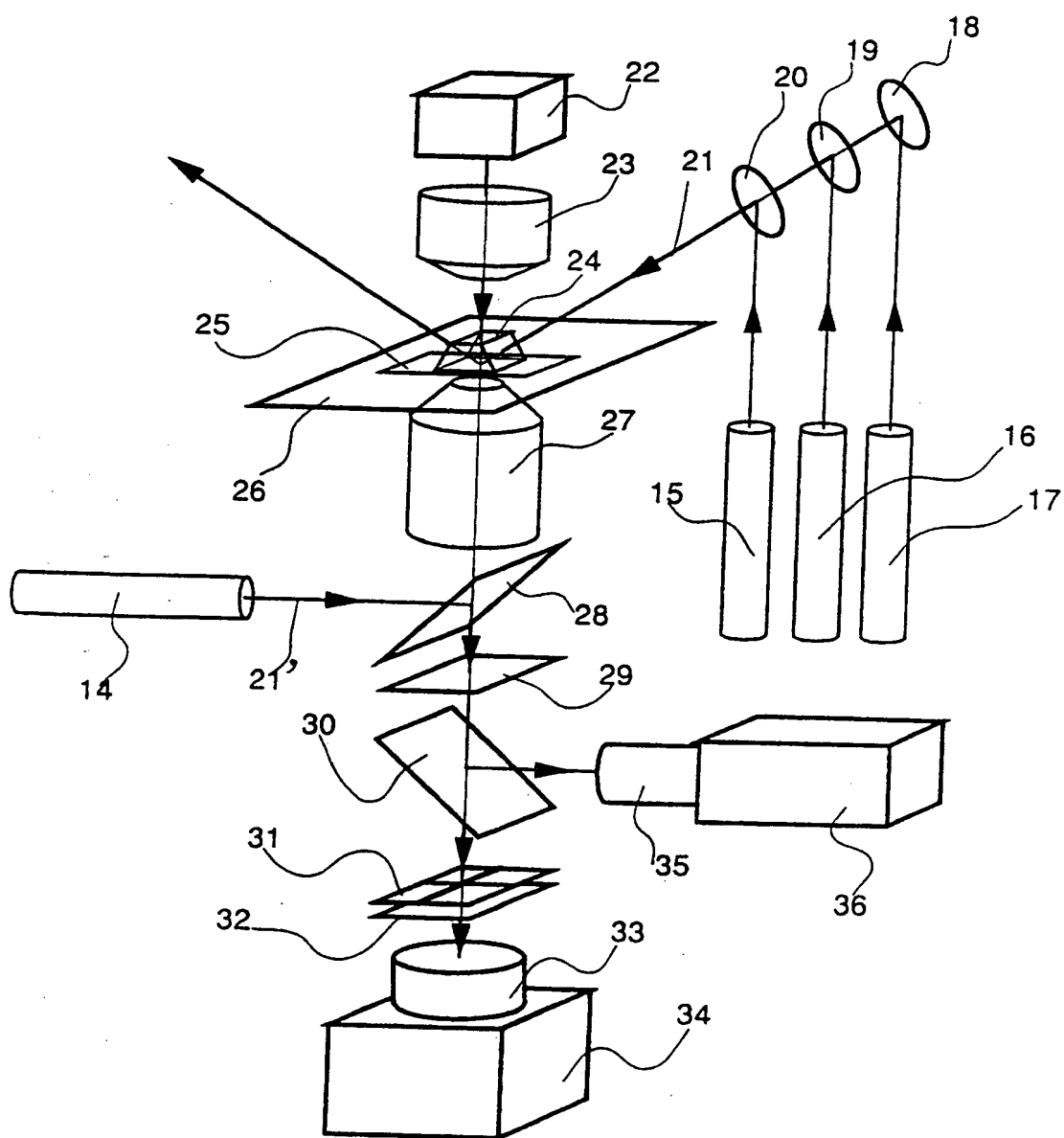
9/36

第9図



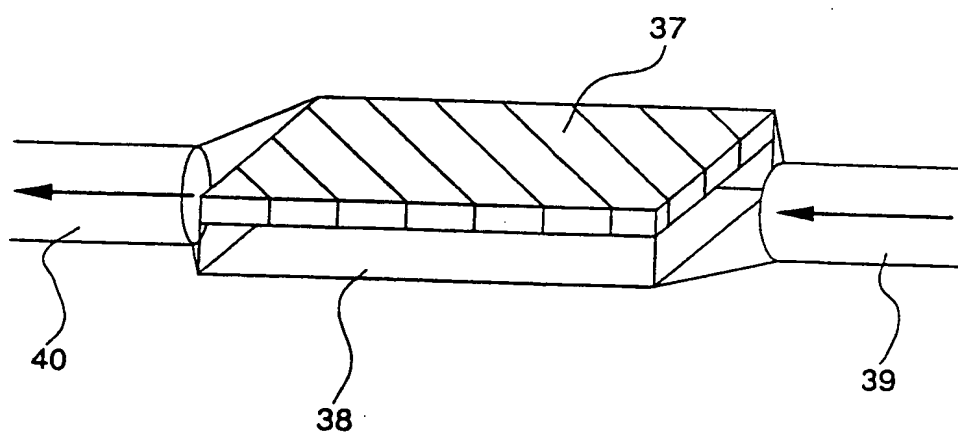
10/36

第10図



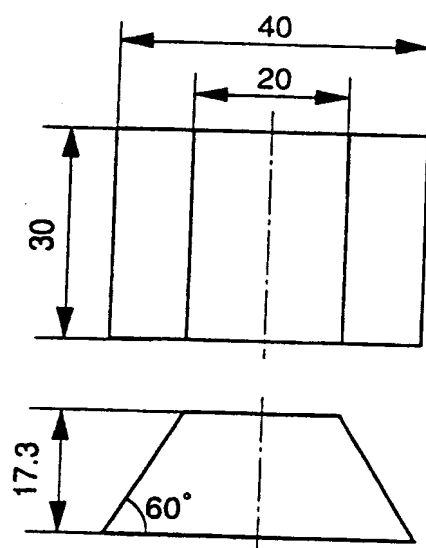
11/36

第11図



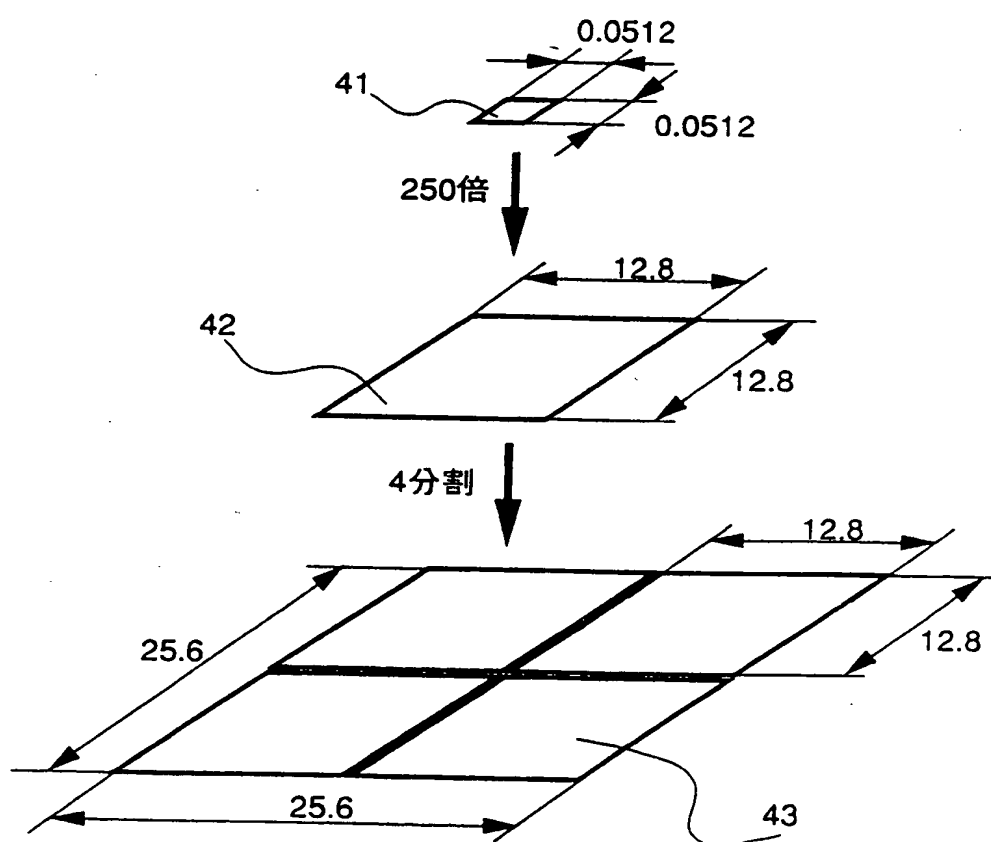
12/36

## 第12図



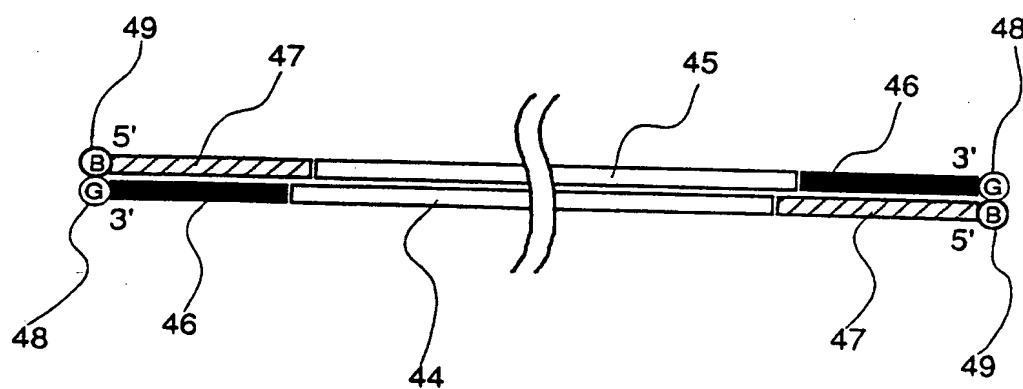
13/36

第13図



14/36

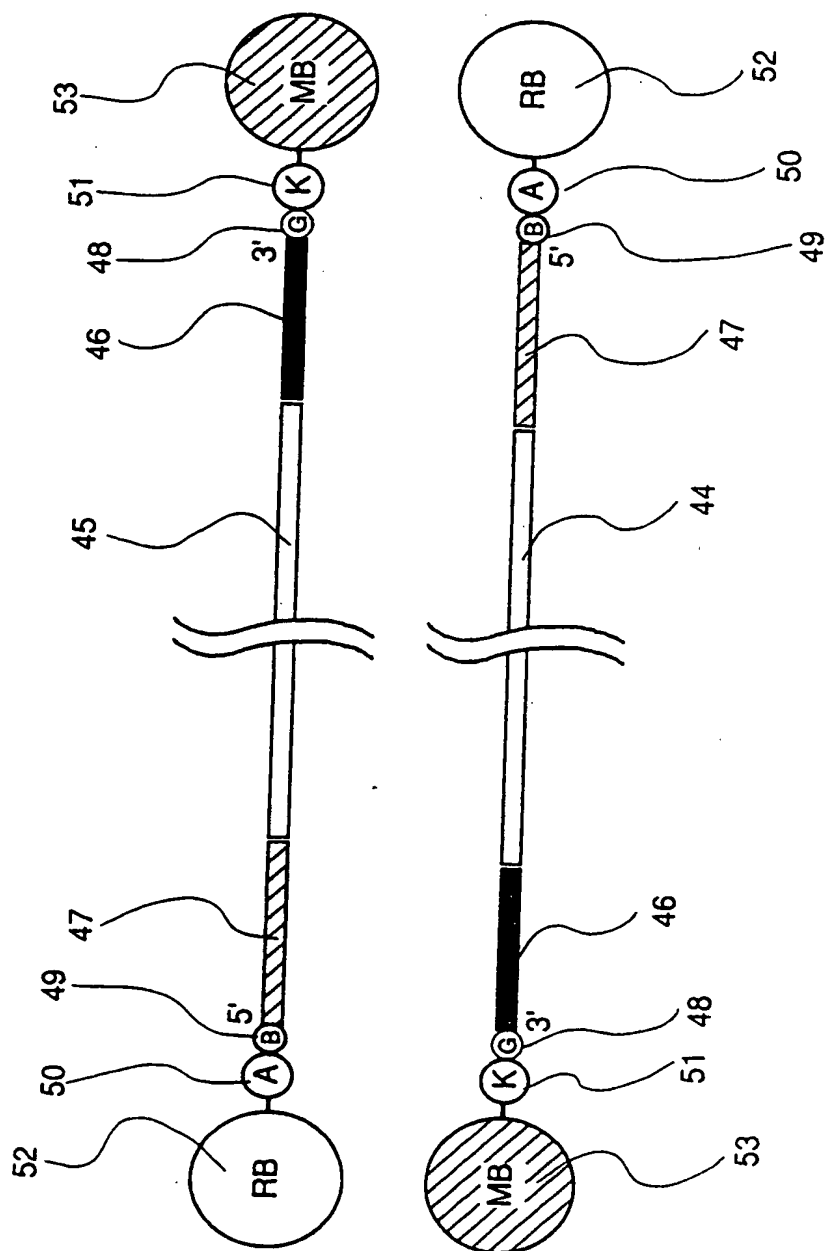
第14図





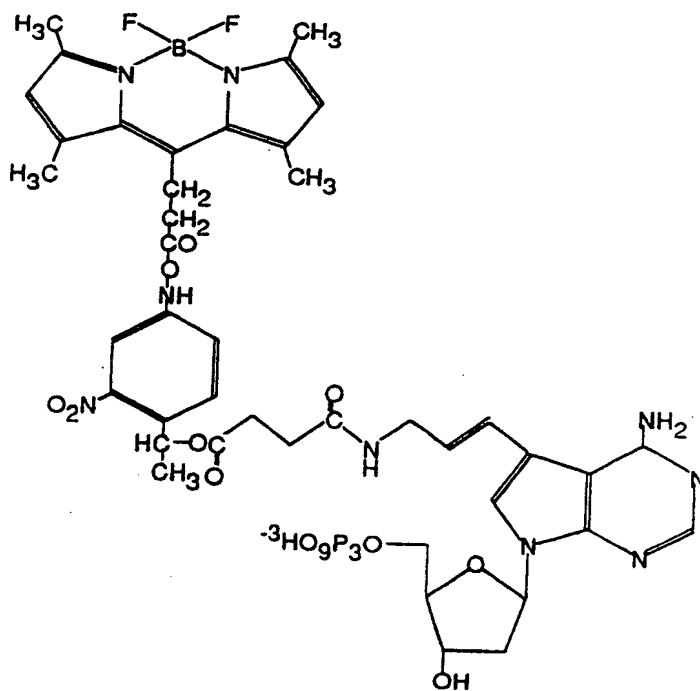
15/36

第15図



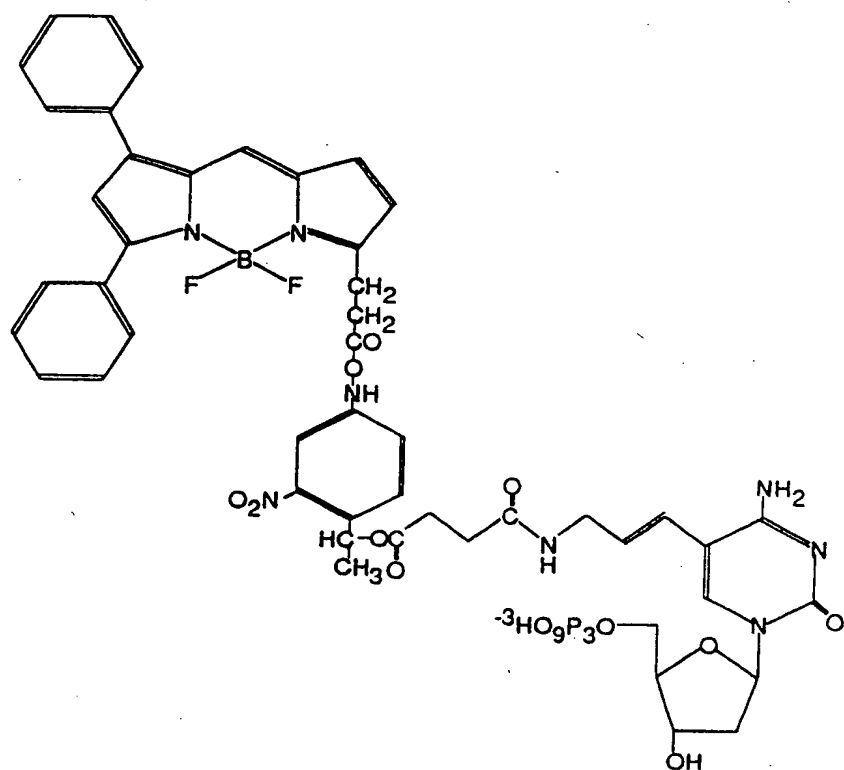
16/36

## 第16図



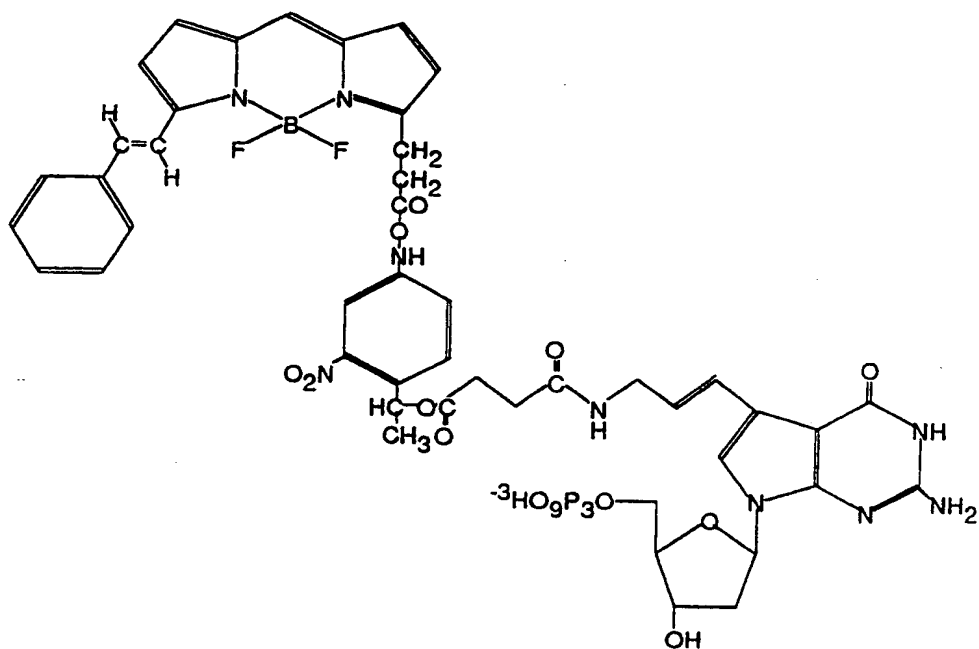
17/36

## 第17図



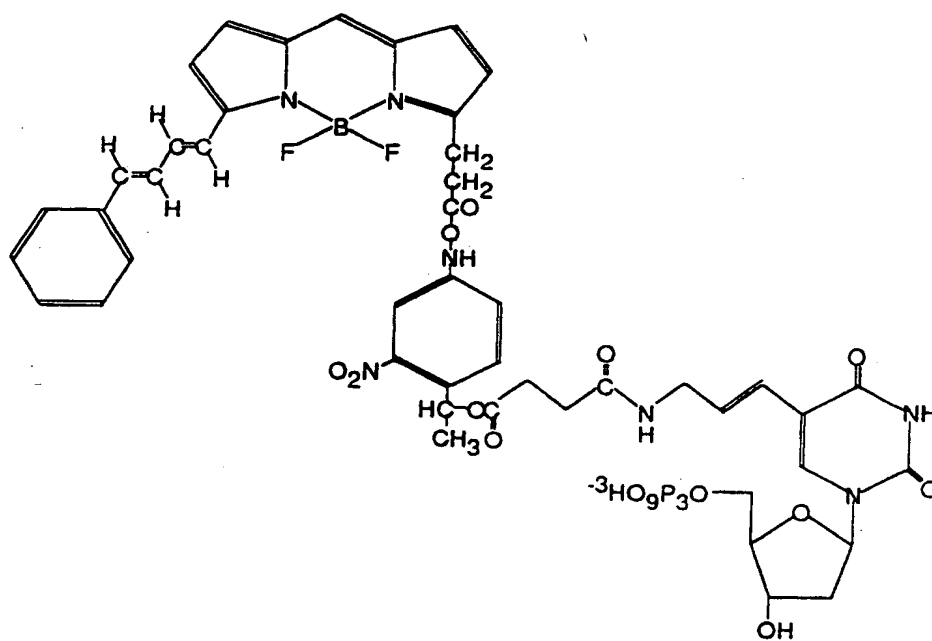
18/36

## 第18図

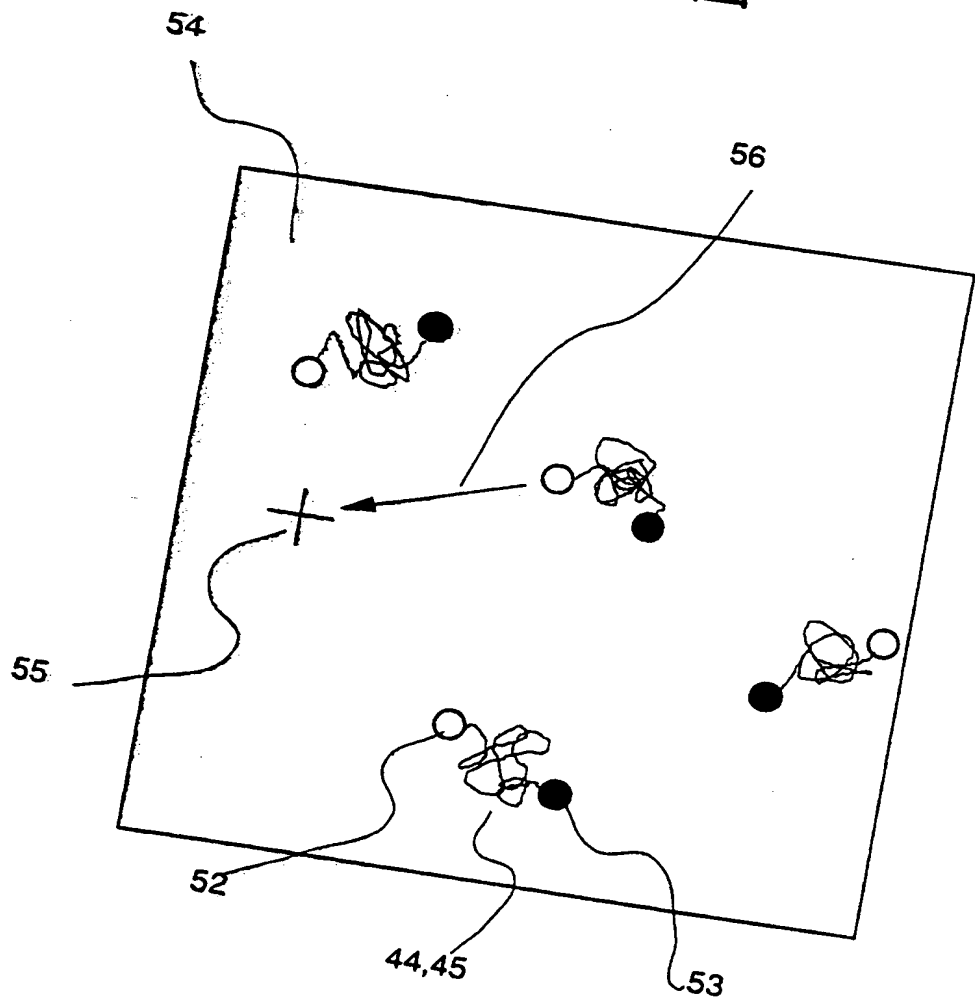


19/36

## 第19図

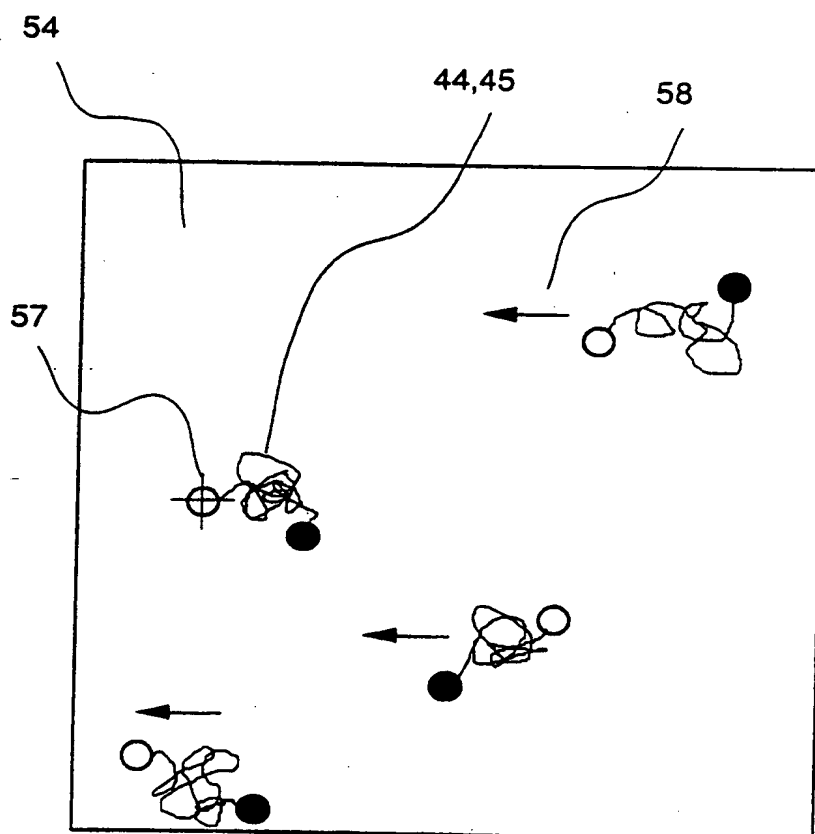


第20図



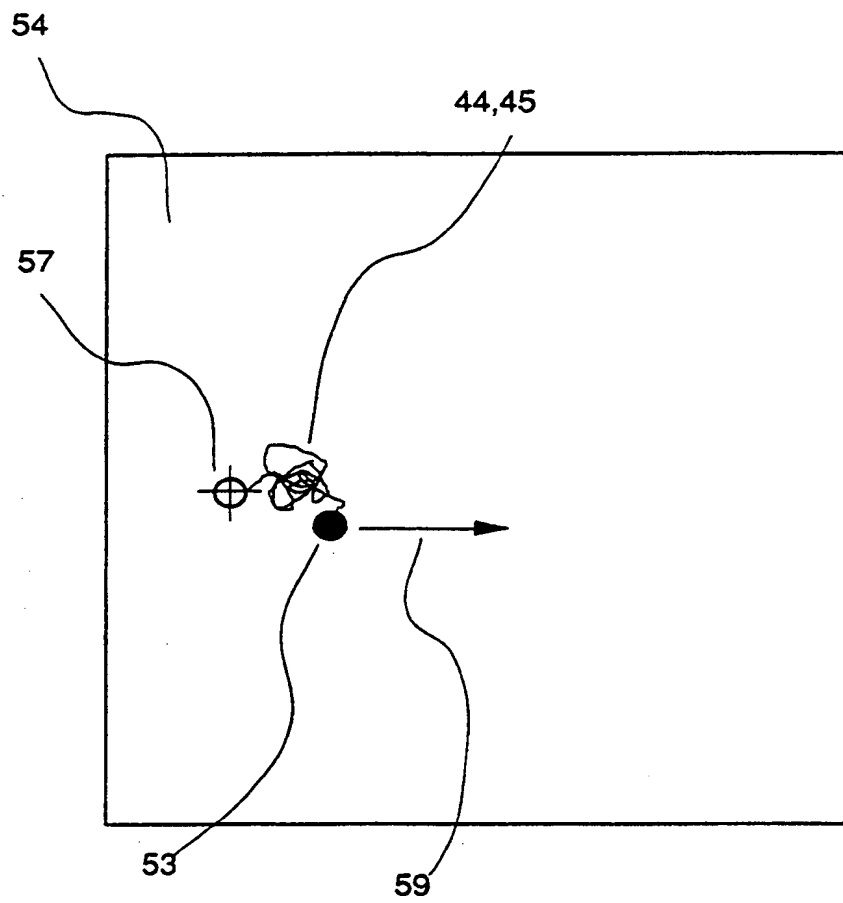
21/36

## 第21図



22/36

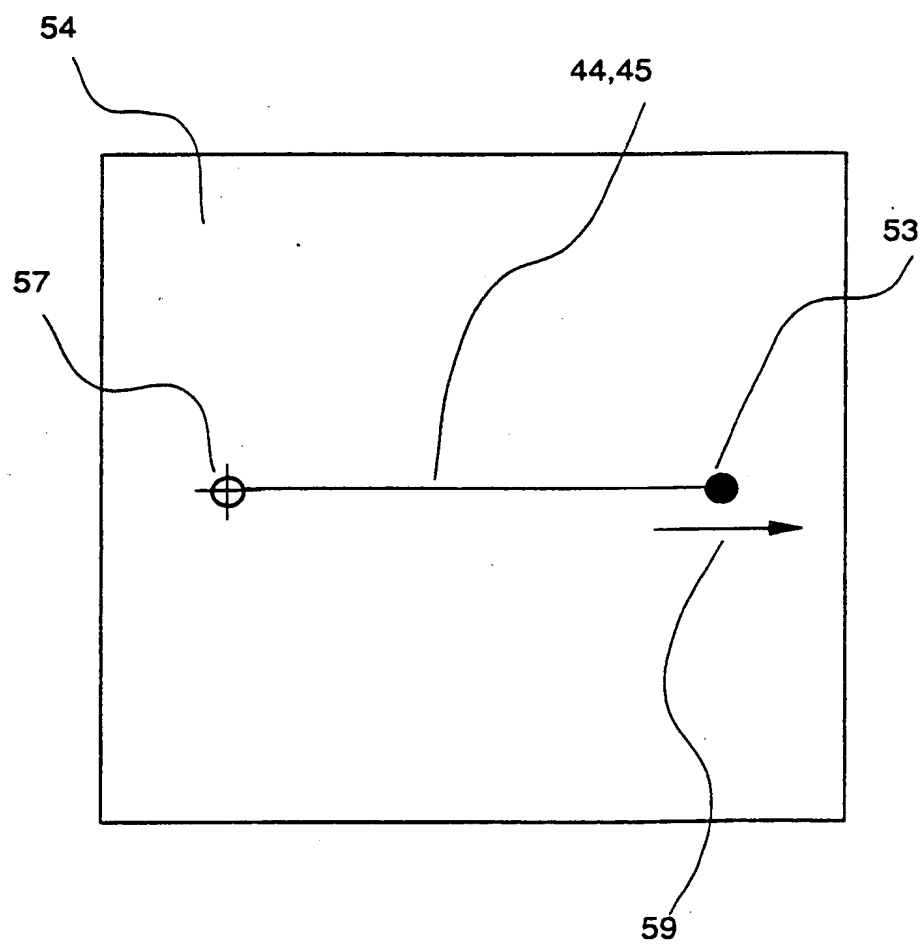
第22図





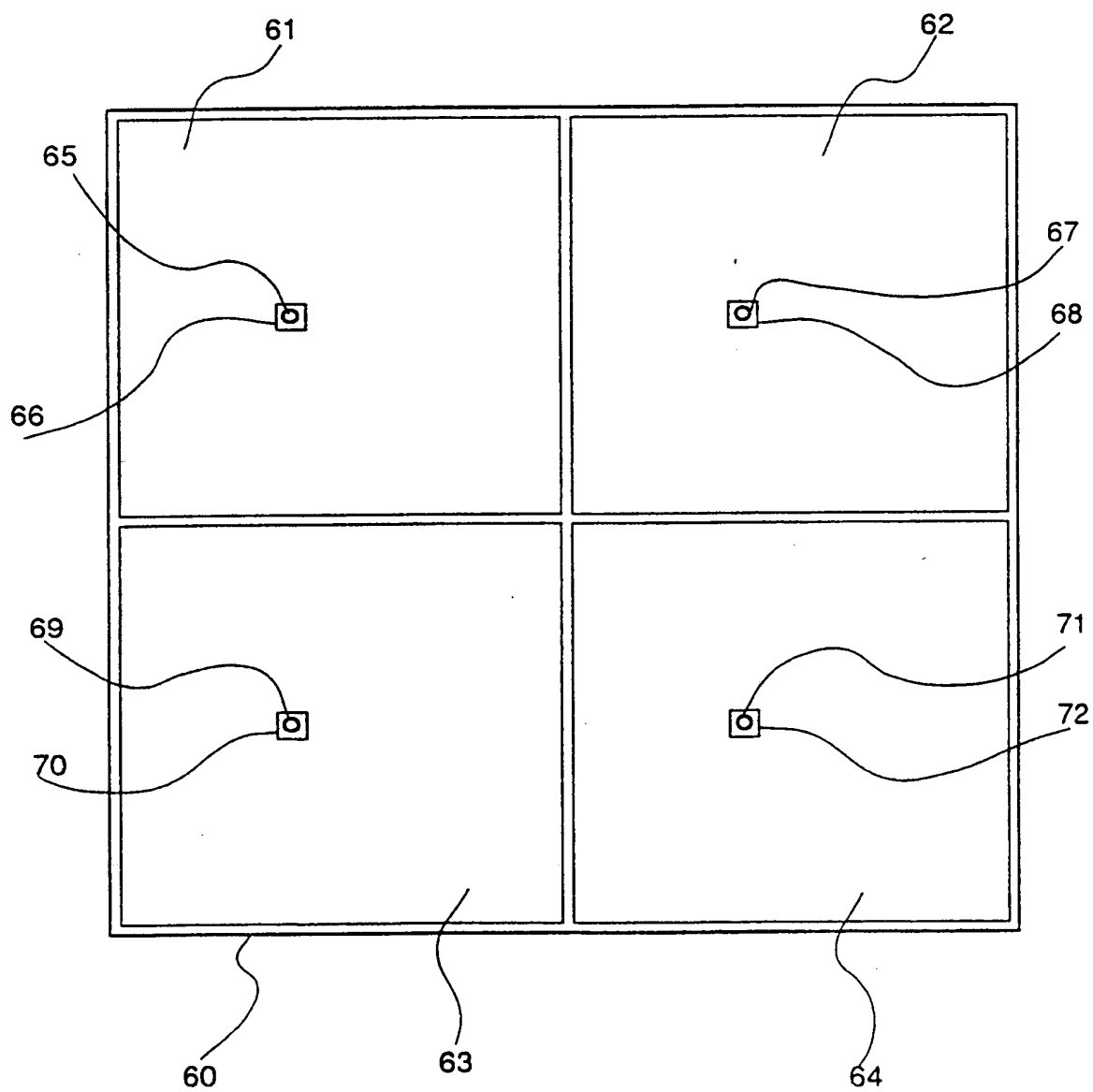
23/36

第23図



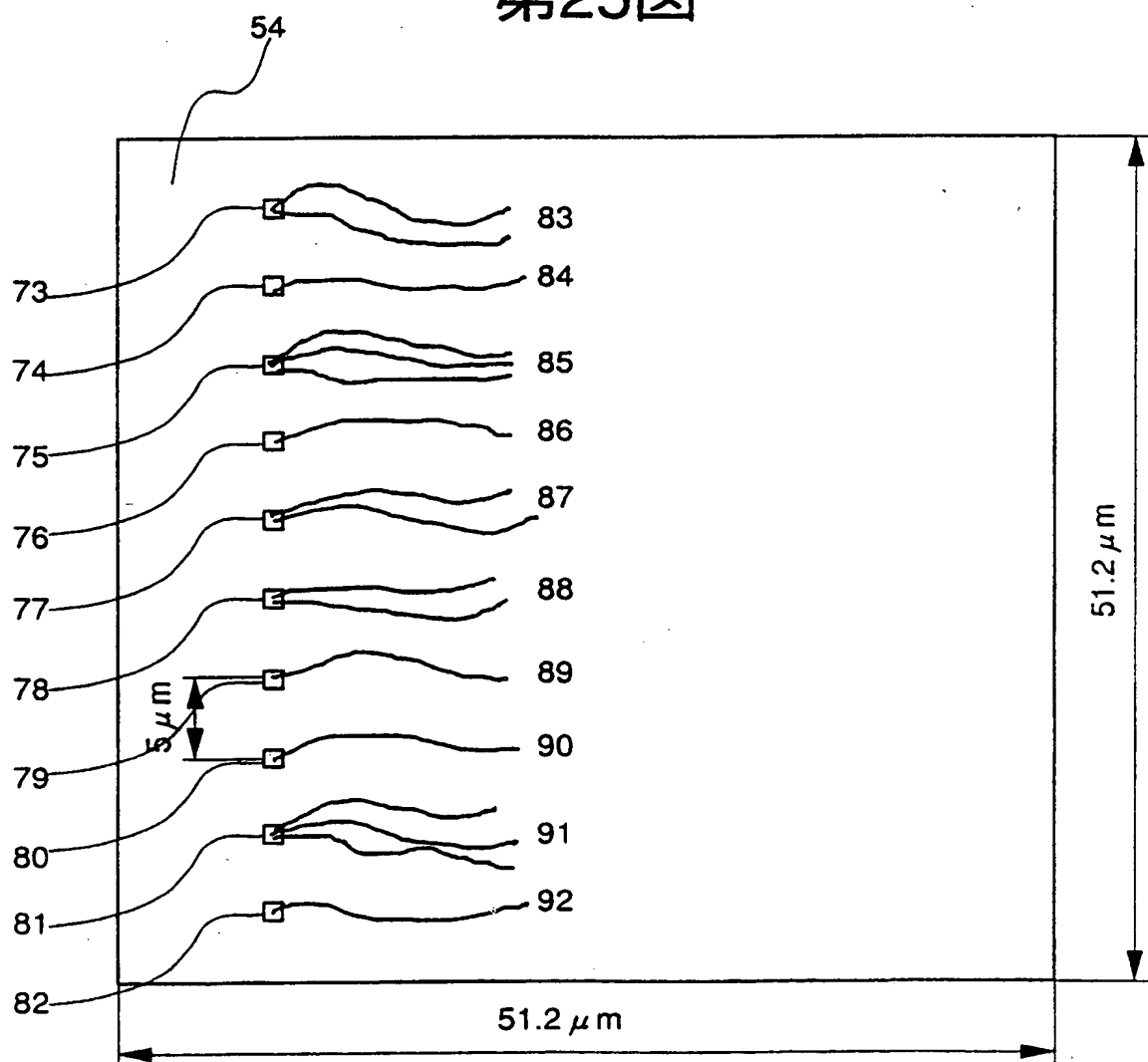
24/36

第24図



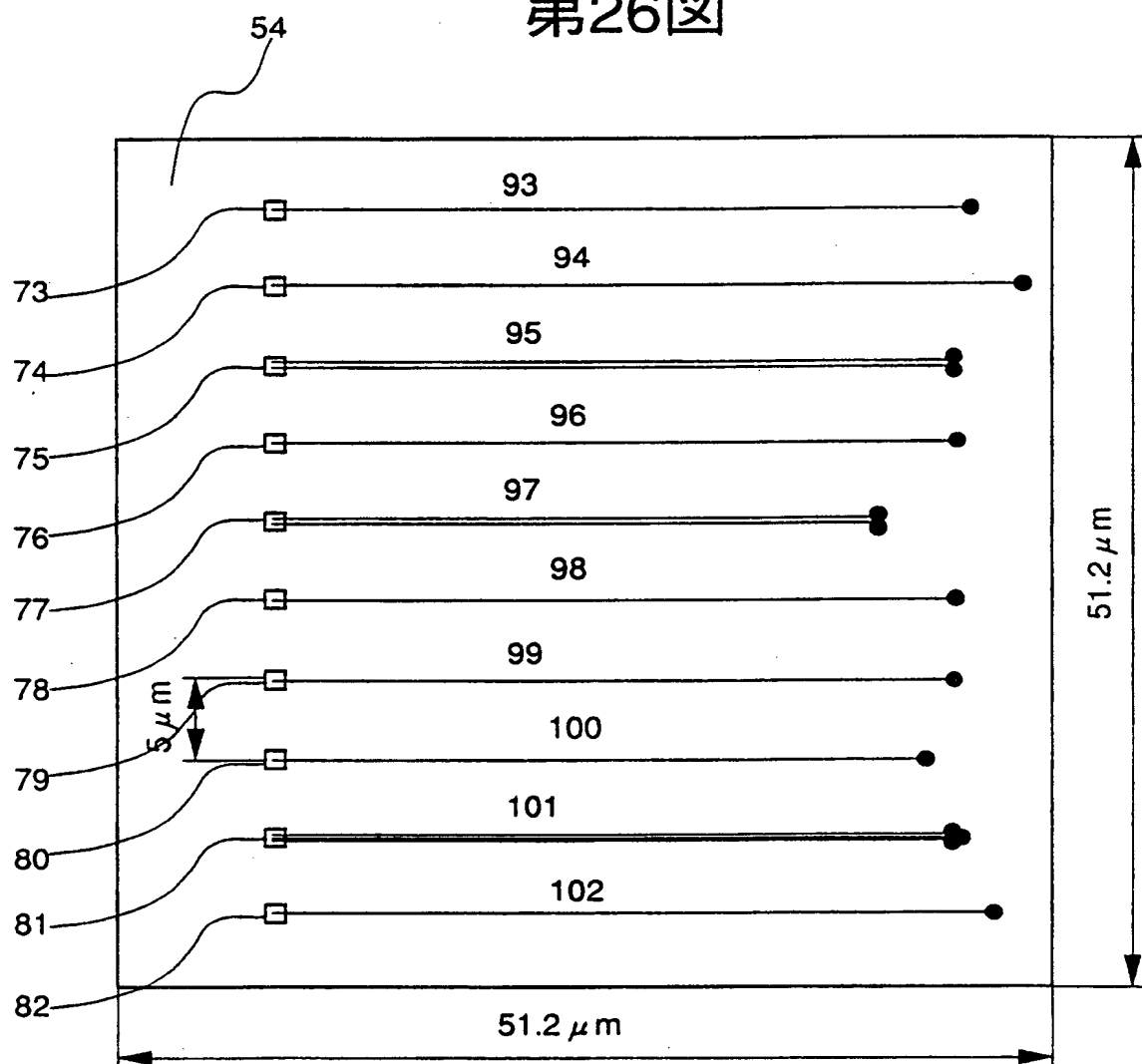
25/36

第25図



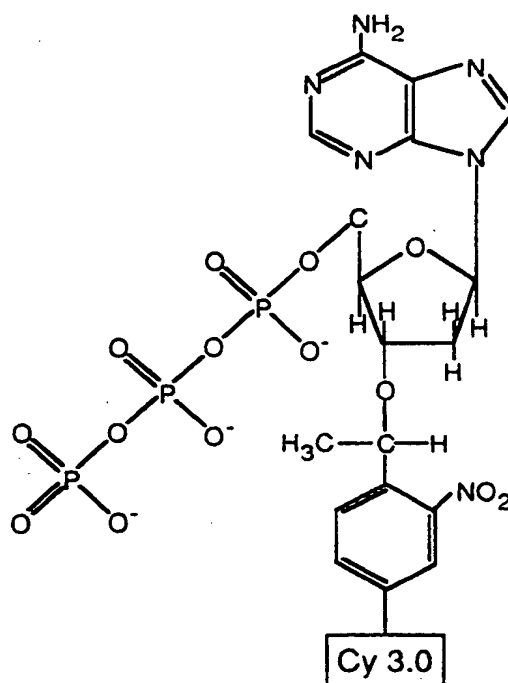
26/36

第26図



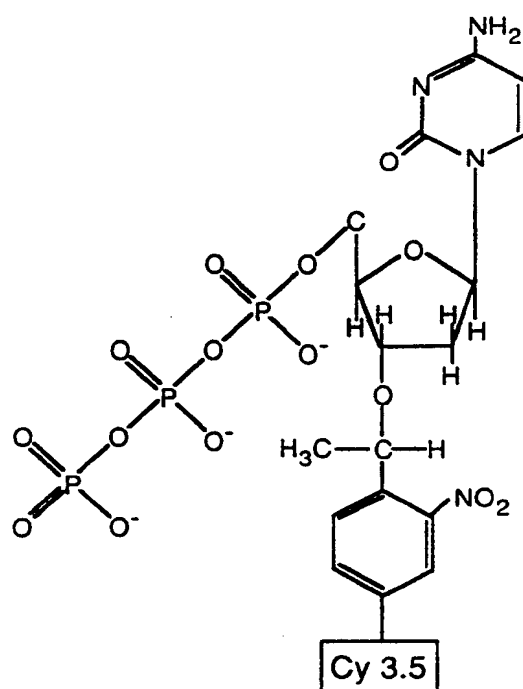
27/36

## 第27図



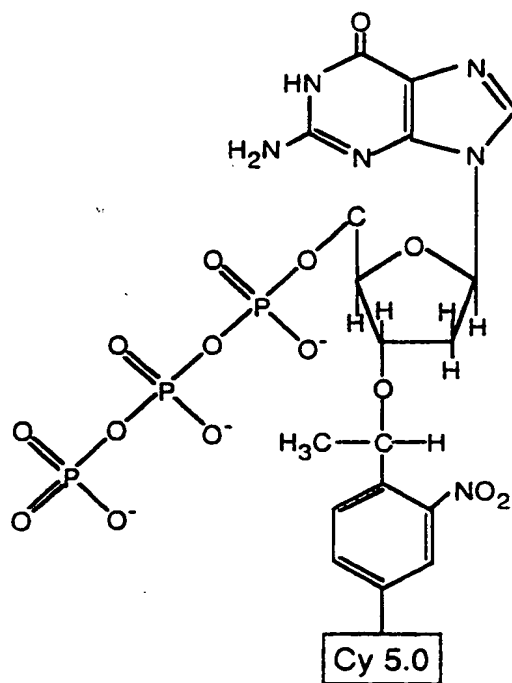
28/36

## 第28図



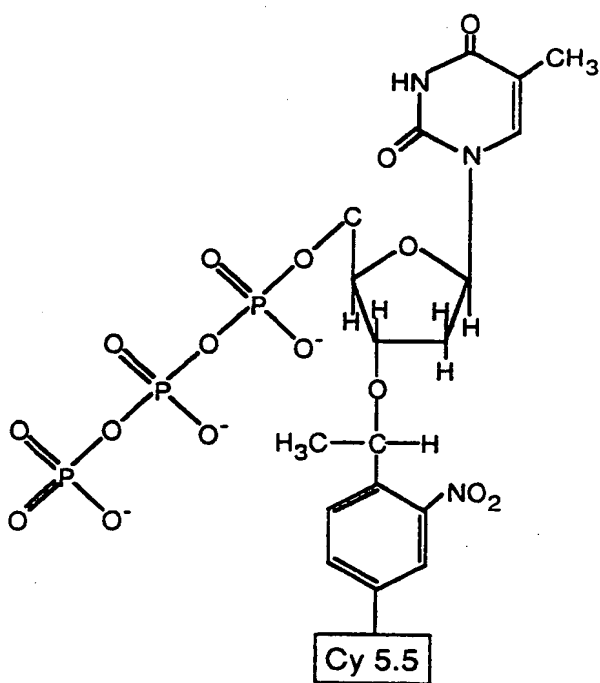
29/36

## 第29図



30/36

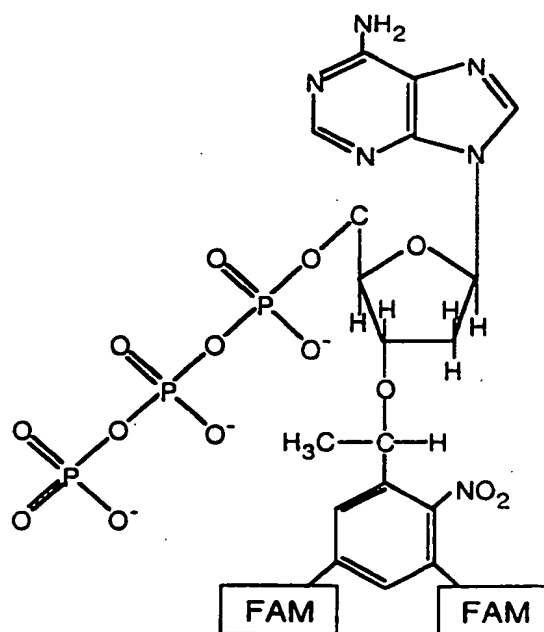
## 第30図





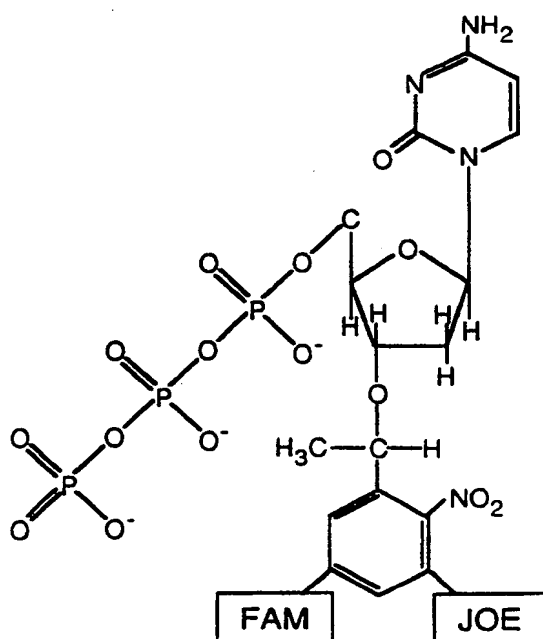
31/36

## 第31図



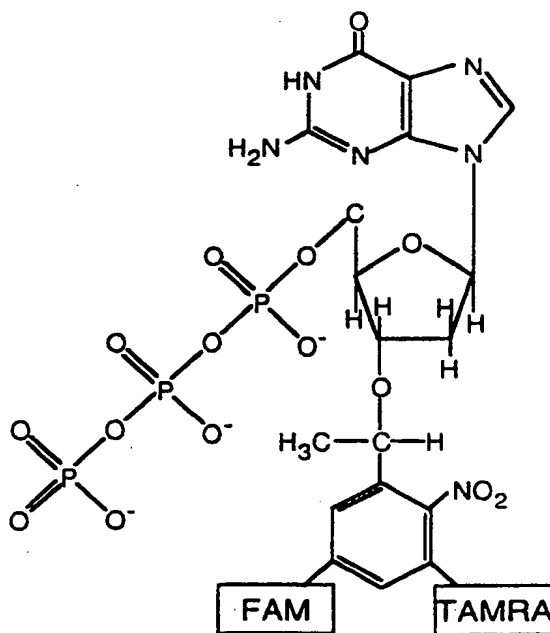
32/36

第32図



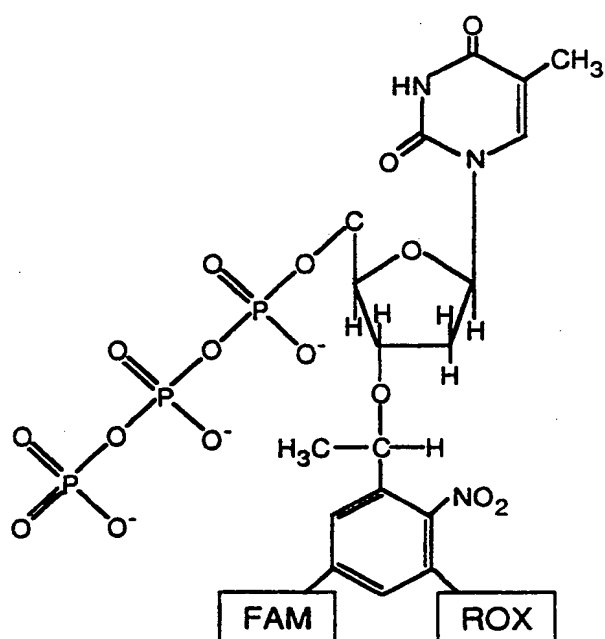
33/36

## 第33図



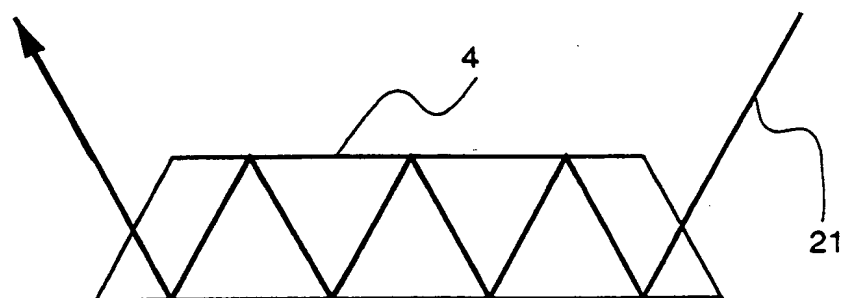
34/36

## 第34図



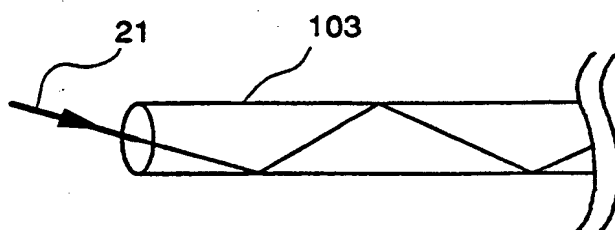
35/36

第35図



36/36

第36図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00239

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. C1 <sup>6</sup> C12Q1/68, C12M1/00, G01N33/50, C12N15/10 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. C1 <sup>6</sup> C12Q1/68, C12M1/00, G01N33/50, C12N15/10 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, BIOSYS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 02-057978, A (Takara Shuzo Co., Ltd.), February 27, 1990 (27. 02. 90) (Family: none)	1 - 32
A	JP, 04-505251, A (Amersham Int. PLC), September 17, 1992 (17. 09. 92) & WO, 90/13666, A & EP, 471732, A	1 - 32
A	JP, 08-332100, A (Hitachi, Ltd.), December 17, 1996 (17. 12. 96) (Family: none)	1 - 32
A	JP, 07-213298, A (Perseptive Biosystems Inc.), August 15, 1995 (15. 08. 95) & EP, 639607, A & US, 5527675, A	1 - 32
A	JP, 07-313168, A (Hideya Terunuma), December 5, 1995 (05. 12. 95) (Family: none)	1 - 32
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search April 16, 1997 (16. 04. 97)		Date of mailing of the international search report April 30, 1997 (30. 04. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

IntCl<sup>°</sup> C12Q1/68, C12M1/00, G01N33/50, C12N15/10

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

IntCl<sup>°</sup> C12Q1/68, C12M1/00, G01N33/50, C12N15/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, BIOSYS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 02-057978, A (寶酒造株式会社) 27. 2月. 1990 (27. 02. 90) (ファミリーなし)	1-32
A	JP, 04-505251, A (Amersham Int. PLC) 17. 9月. 1992 (17. 09. 92) & WO, 90/13666, A & EP, 471732, A	1-32
A	JP, 08-332100, A (株式会社日立製作所) 17. 12月. 1996 (17. 12. 96) (ファミリーなし)	1-32

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 04. 97

国際調査報告の発送日

30.04.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤 田 節



4B 9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3449



## C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 07-213298, A (Perceptive Biosystems Inc.) 15. 8月. 1995 (15. 08. 95) & EP, 639607, A & US, 5527675, A	1-32
A	JP, 07-313168, A (照沼 秀也) 5. 12月. 1995 (05. 12. 95) (ファミリーなし)	1-32

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

XP-002145019

AN - 1998-437489 [37]

AP - WO1997JP00239 19970131; JP19980532696 19970131; [Based on WO9833939 ]  
; WO1997JP00239 19970131

CPY - HITA

DC - B04 D16 S03

DS - AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

FS - CPI;EPI

IC - C12M1/00 ; C12N15/10 ; C12Q1/68 ; G01N33/50

IN - ANAZAWA T; KAMBARA H; OKANO K; UEMATSU C

MC - B04-B03B B04-E05 B11-C07B3 B11-C08E5 B12-K04F D05-H10 D05-H18A

- S03-E14H

PA - (HITA ) HITACHI LTD

PN - JP10532696T T 20000627 DW200036 C12Q1/68 000pp

- WO9833939 A1 19980806 DW199837 C12Q1/68 Jpn 079pp

PR - WO1997JP00239 19970131

XA - C1998-133122

XIC - C12M-001/00 ; C12N-015/10 ; C12Q-001/68 ; G01N-033/50

XP - N1998-340780

AB - WO9833939 Base sequence of a single one-stranded DNA molecule is determined by:

- (a) immobilising a molecule to a fixing bead at one end and a magnetic bead at the other;
- (b) fixing one end of the molecule within the visual field of a fluorescence microscope using the fixing bead;
- (c) extending the molecule by applying a magnetic field;
- (d) hybridising a primer at one end of the molecule;
- (e) carrying out a chain extension reaction with a polymerase in the presence of the four possible nucleotides (chemically modified (e.g. as a ketide or 2-nitrobenzyl derivative, preferably on the purine or pyrimidine base or on the 3-position of the ribose ring) and fluorescence labelled, with a different label for each nucleotide, fluorescing at different wavelengths) to add a single nucleotide to the chain;
- (f) exciting the molecule with a laser and observing the evanescent radiation with the fluorescence microscope thus determining which of the labelled nucleotides has been incorporated in the chain;
- (g) removing the fluorescence label by irradiation with an ultraviolet laser;
- (h) repeating steps (e) to (g) to progressively build up the second strand of the DNA molecule and determine the base sequence.
- Also claimed is an apparatus for carrying out this process.
- USE - The process is used for rapid and accurate automated sequencing of genomic DNA and DNA fragments.
- ADVANTAGE - A sequencing rate of 1 million bases in 6 days is possible with this method.
- (Dwg.10/36)

DN - CN JP KR US

IW - DETERMINE BASE SEQUENCE SINGLE DNA MOLECULAR ATTACH FLUORESCENT LABEL  
BASE ONE ONE REMOVE LABEL BASE ADD FORMATION SECOND STRAND PROGRESS

IKW - DETERMINE BASE SEQUENCE SINGLE DNA MOLECULAR ATTACH FLUORESCENT LABEL  
BASE ONE ONE REMOVE LABEL BASE ADD FORMATION SECOND STRAND PROGRESS

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

INW - ANAZAWA T; KAMBARA H; OKANO K; UEMATSU C

NC - 021

OPD - 1997-01-31

ORD - 1998-08-06

PAW - (HITA ) HITACHI LTD

TI - Determination of base sequence of single DNA molecule - by attaching  
fluorescence-labelled bases one by one with removal of label before  
next base is added as formation of second strand progresses

THIS COPY IS FOR THE

BASE REMOVAL STEP ADD FORMATION OF SECOND STRAND PROGRESS

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**